

· 基础研究 ·

## Bmal1 调控 T 型钙离子通道对慢性心衰室性心律失常昼夜节律的影响

俞 灏, 周子皓, 张南南, 薛思源, 钱智勇, 王 垚, 邹建刚\*

南京医科大学第一附属医院心血管内科, 江苏 南京 210029

**[摘要]** **目的:**探究生物钟基因 Bmal1 调控 T 型钙离子通道(T-type calcium channel, TTCC)对慢性心衰(chronic heart failure, CHF)室性心律失常(ventricular arrhythmia, VA)昼夜节律的影响及可能的调控机制。**方法:**采用主动脉缩窄术(TAC)构建 C57BL/6J 小鼠慢性心力衰竭模型(CHF), 设定假手术对照组(CON)及 TTCC 抑制剂米贝拉地尔(MIB)治疗组(CHF+MIB)。使用心脏超声评估各组小鼠心功能, 免疫组织化学染色(IHC)及蛋白免疫印迹法(WB)测定心肌 TTCC 表达。使用程序性电刺激(PES)诱发室性心律失常(VA), 采用 WB 及实时定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测心肌组织 Bmal1、TTCC 昼夜节律变化及关系。使用染色质免疫共沉淀技术(ChIP)揭示 Bmal1 调控 TTCC 的分子机制。**结果:**与 CON 组相比, CHF 小鼠心脏收缩功能显著降低, 心腔扩大且伴有明显心肌肥厚, 心肌中 TTCC 表达量明显增加, 行 PES 检测发现 CHF 小鼠 VA 发作率明显增加, 且有昼夜节律差异, 使用 MIB 可一定程度降低 CHF 小鼠 VA 的发生。Western blot 及 qRT-PCR 结果提示 CHF 小鼠心肌中 Bmal1 及 TTCC 表达呈昼夜节律性变化, ChIP 检测提示 Bmal1 可直接结合到 TTCC 启动子区域的 E-box 位点调控 TTCC 的转录。**结论:** CHF 小鼠中, TTCC 通道重新高表达且呈昼夜节律性, 使用 MIB 可降低 CHF 小鼠 VA 发作, Bmal1 可通过直接结合 TTCC 启动子区域的 E-box 位点调控 TTCC 的转录。

**[关键词]** 室性心律失常; 慢性心力衰竭; T 型钙离子通道; 生物钟**[中图分类号]** R541.7**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2022)05-610-08**doi:** 10.7655/NYDXBNS20220502

## Effect of Bmal1 regulation of T-type calcium channel on the circadian rhythm of chronic heart failure ventricular arrhythmias

YU Hao, ZHOU Zihao, ZHANG Nannan, XUE Siyuan, QIAN Zhiyong, WANG Yao, ZOU Jiangang\*

Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

**[Abstract]** **Objective:** This study aims to Explore the effect of circadian clock gene of brain and muscle ARNT-like protein-1 (Bmal1) regulated T-type calcium channel(TTCC) on circadian rhythm of chronic heart failure(CHF) ventricular arrhythmia(VA) and its possible mechanisms. **Methods:** The C57BL/6J mice CHF model was established by transverse aortic constriction(TAC) and mice in control group(CON) were treated with sham operation. Some TAC mice were randomly assigned to receive TTCC inhibitor mibefradil (MIB) for 2 weeks(CHF+MIB). Cardiac function was assessed by echocardiographic and the expression level of TTCC was determined by immune histochemical (IHC) staining and Western blot (WB). Ventricular arrhythmia (VA) was induced through programmed electrical stimulation(PES) in each group. The circadian rhythms of Bmal1 and TTCC were detected by WB and real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR), and the molecular mechanism by which Bmal1 regulated TTCC was determined by chromatin immunoprecipitation (ChIP). **Results:** Compared with CON group, CHF mice had significantly reduced cardiac systolic function, increased internal diameter accompanied by obvious cardiac hypertrophy. Significantly increased TTCC re-expression level in CHF mice myocardium was detected by IHC staining and WB. PES indicated that VA occurrence was significantly increased when comparing CHF mice with CON mice. To a certain extent, using MIB could reduce the occurrence of VA in CHF mice. In addition, VA occurrence appeared circadian rhythm in all three groups (CON, CHF and CHF+MIB). WB and qRT-PCR results

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81870251)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: jgzou@njmu.edu.cn

suggested that the expressions of Bmal1 and TTCC in the myocardium of CHF mice exhibited circadian rhythm and ChIP suggested that Bmal1 could directly bind to the E-box site of TTCC promoter to regulate TTCC. **Conclusion:** In CHF mice, TTCC channel is highly re-expressed and shows circadian rhythm, and MIB can reduce the occurrence of VA in CHF mice. Bmal1 can directly bind to the E-box site of TTCC promoter region to regulate the transcription of TTCC.

**[Key words]** ventricular arrhythmia; chronic heart failure; T-type calcium channel; circadian clock

[J Nanjing Med Univ, 2022, 42(05): 611-618]

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是导致60岁以上老年人住院的最常见的心血管疾病,且患者预后差,5年存活率只有50%左右<sup>[1]</sup>。一项亚洲心衰猝死研究(ASIAN-HF)报道,19.2%的心衰患者在1年内死亡或因心力衰竭再住院<sup>[2]</sup>。CHF患者易发生心脏性猝死(sudden cardiac death, SCD),而SCD的主要原因为各种恶性室性心律失常(ventricular arrhythmia, VA)<sup>[3]</sup>。研究发现,CHF患者VA/SCD的发作表现出明显的昼夜节律,清晨时为发作高峰,称为晨峰现象<sup>[4]</sup>,提示生物钟在CHF患者VA/SCD的发作中发挥重要作用。

脑和肌肉芳香烃受体核转运样蛋白1(brain and muscle ARNT-like protein-1, Bmal1)基因是调节昼夜节律的关键生物钟基因之一,其作为转录因子与昼夜运动输出周期蛋白(circadian locomotor output cycles kaput, Clock)基因结合为异质二聚体,通过结合到靶基因启动子上游的E-box序列发挥调控作用<sup>[5]</sup>。心脏内源性生物钟对心脏功能具有广泛的调控作用,参与正常心率、血压的维持,在急性心梗、心功能不全、高血压等心血管疾病中发挥重要作用<sup>[4,6]</sup>。有研究报道,在小鼠心脏中,Bmal1可调控钠离子电压门控通道 $\alpha$ 亚单位5基因(sodium voltage-gated channel  $\alpha$  subunit 5, Scn5a)和钾离子电压门控通道 $\alpha$ 亚单位2基因(potassium voltage-gated channel subfamily h member 2, Kcnh2)的转录,影响钠离子电压门控通道1.5亚型(voltage-gated sodium channels, Nav1.5)和快速激活延迟整流钾电流(rapidly activating delayed rectifier potassium current, I<sub>Kr</sub>)通道,心脏特异性敲除Bmal1基因将直接导致VA/SCD发生增加<sup>[7-8]</sup>。本课题组既往研究也发现心肌中L型钙离子通道(L-type calcium channel, LTCC)表达和电流具有昼夜节律特征,并证明了Clock-Bmal1通过调节Akt的T308位点磷酸化参与调控LTCC的生物节律<sup>[9]</sup>。因此,Bmal1可调控心肌细胞膜上的离子通道,参与心律失常的发生。

在心血管系统中除LTCC外,还有T型钙离子通

道(T-type calcium channel, TTCC)<sup>[10]</sup>。TTCC在心脏中分为Ca<sub>v</sub>3.1(CNCNA1G,  $\alpha$ 1G)和Ca<sub>v</sub>3.2(CNCNA1H,  $\alpha$ 1H)两种亚型,生理情况下,心室中的TTCC仅在胚胎期表达,随着心室细胞逐渐成熟,其表达量逐渐降低,在成年心室肌细胞中基本不表达<sup>[10-11]</sup>。有研究报道,TTCC在心肌肥厚合并心衰的心脏中表达量明显上调,且这可能是导致室性心律失常发生的原因之一<sup>[12-13]</sup>。Kinoshita等<sup>[14]</sup>发现,在心梗后心衰小鼠中使用TTCC阻滞剂可以减少小鼠的心源性猝死。那么,生物钟调控VA/SCD事件的昼夜节律是否与TTCC有关,生物钟基因Bmal1又是如何调控TTCC的,目前尚无相关研究。

结合目前研究现状,本研究采用主动脉缩窄术(transverse aortic constriction, TAC)构建心衰小鼠模型,应用免疫组织化学染色,程序性电刺激,染色质免疫共沉淀等技术探究Bmal1调控TTCC对慢性心衰室性心律失常昼夜节律的影响及可能的调控机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

小鼠C57BL/6J(南京大学模式动物研究所),均为4~8周龄的雄鼠,待其成年后行TAC手术构建慢性心衰小鼠模型。小鼠饲养于无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级动物房,室温20~25℃,相对湿度40%~50%,噪声<60 dB,每12 h开关照明昼夜循环,自由进食。本研究所有小鼠实验均严格遵循动物实验“3R”原则,按照中华人民共和国国家标准《实验动物福利伦理审查指南》(GB/T27416-2014)执行。所有小鼠实验均经南京医科大学动物管理和伦理委员会批准(编号:IACUC-2005052)。

GAPDH抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司)、Bmal1抗体(CST公司,美国)、Clock抗体(CST公司,美国)、Ca<sub>v</sub>3.1抗体(CACNA1G,  $\alpha$ 1G, Abcam公司,美国)、Ca<sub>v</sub>3.2抗体(CACNA1H,  $\alpha$ 1H, Abclonal公司,美国)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白抗体( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA, 湖南艾方生物科技有限公司)、半

乳糖凝集素-3抗体(Galectin-3, GAL-3, 湖南艾方生物科技有限公司)、羊抗鼠二抗(南京兰杰柯科技有限公司)、羊抗兔二抗(南京兰杰柯科技有限公司);全蛋白提取试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)反转录试剂盒、克隆用聚合酶链式反应酶LA Taq(南京诺唯赞生物科技股份有限公司);SYBR GREEN 实时定量PCR试剂盒(Invitrogen公司, 美国);异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)、米贝拉地尔(mibefradil, MIB)(Sigma公司, 美国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 CHF造模及小鼠分组

使用1%戊巴比妥钠, 30 mg/kg腹腔注射麻醉小鼠。小鼠仰卧姿势摆放于37℃预热的加热操作台, 脱去颈部及前胸部毛发并对裸露皮肤消毒处理, 经口腔气管插管后连接小动物呼吸机, 在胸骨上沿中部偏左位置用剪刀小心开胸至第二肋骨位置, 在第一分支(无名动脉)和第二分支(左颈动脉)之间穿以6-0号丝线并结扎于27 G的针头上, 缩窄主动脉, 假手术组(CON)做同样的处理但不结扎主动脉。术后4周行小鼠心脏超声评估心功能。选取CHF的小鼠, 予TTCC抑制剂米贝拉地尔(MIB)10 mg/kg/d腹腔注射2周。分组如下: CON组: 行假手术小鼠作为对照组, CHF组: 主动脉缩窄手术心衰组, CHF+MIB组: CHF小鼠腹腔注射MIB治疗组。

取样: 自晚6点关灯起暗适应36 h, 后从晨6点起, 每4 h取样1次, 收取48 h左心室组织标本冻存于-80℃冰箱, 分别标记为CT(circadian time, CT)0、CT4、CT8、CT12、CT16、CT20、CT24、CT28、CT32、CT36、CT40、CT44, 供后续实验使用。

### 1.2.2 小鼠心脏超声检测

小鼠心脏超声检测在江苏省人民医院公共实验动物中心进行。使用仪器为配有30 MHz高频探头的VisualSonic Vevo2100型超声仪(VisualSonics公司, 加拿大)。在使用异氟烷麻醉小鼠后, 沿仰卧小鼠胸骨旁左室乳头肌水平短轴和长轴切面采集左室图像, 同时在二维图像引导下分别获取5个以上连续心动周期M-mode超声影像。根据采集影像使用软件分析结果, 得到心超参数。

### 1.2.3 心脏切片染色

处死小鼠后, 分离心脏标本, 10%磷酸缓冲液福尔马林固定24~48 h。HE染色及Masson染色按照试剂盒说明书中的方法进行, 普通光镜下观察拍照。免疫组织化学(immunohistochemical, IHC)染

色( $\alpha$ -SMA, Gal-3,  $\alpha$ 1G,  $\alpha$ 1H, 1:200)按照常规方法进行, 每张切片滴加一抗溶液50  $\mu$ L, 次日滴加显色剂DAB工作液50  $\mu$ L观察显色。IHC阳性染色为棕黄色。每个心脏样本取3个切片, 在630 $\times$ 视野下随机选取5个视野, Image J计算心肌细胞横截面面积, 纤维化面积, 及免疫组化染色面积阳性率, 取平均值。

### 1.2.4 小鼠程序性电刺激(programmed electrical stimulation, PES)

为了排除中枢生物钟通过自主神经系统对心脏电生理特性的调控, 本部分采用小鼠离体心脏灌流条件下进行程序性电刺激诱发室性心律失常的发生。小鼠经过戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 开胸取出心脏, 迅速置于4℃预冷生理盐水中, 清洗残余血液。分离主动脉, 在主动脉中插入7F鞘管, 将鞘管调整至主动脉内合适位置(主动脉瓣开口上方)固定, 10 mL注射器连接鞘管, 用灌流液注入心脏, 排净心脏内血液, 最后连于Langendorff灌流装。氧饱和灌流液持续灌流, 灌流速度控制为3 mL/min, 温度控制为37℃, 并将心脏浸浴于灌流液中, 两根心电记录电极分别接在主动脉根部与心尖部, 稳定灌流20 min, 使心电图图形稳定。

起搏电极为银质双极起搏电极, 将两电极分别置于左心室心尖部, 极间距为1 mm。采用200%阈值的刺激强度, 基础频率为150 ms的S1-S1刺激, S1-S2间隔由起始的150 ms以每5 ms的幅度递减至心脏不应期, S1:S2为8:1, 即8次S1刺激后1次S2刺激。按心脏刺激程序直至重复使用3个连续期前刺激以确定是否能够诱发VA。

### 1.2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)

收集处理提取小鼠心脏组织, 加入预冷的RIPA裂解液提取组织总蛋白。常规SDS-PAGE凝胶电泳、湿法转膜, 5%BSA溶液室温封闭2 h, 随后加入一抗(1:1 000)置于4℃冰箱孵育过夜。TBST洗膜后加入二抗(1:5 000), 室温孵育2 h, 洗膜后化学发光显影, 使用Image J图像分析软件分析蛋白相对表达量。

### 1.2.6 实时定量逆转录聚合酶链反应(real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR)

采用TRIzol试剂按操作说明书提取心肌组织总RNA。根据试剂盒操作说明进行后续qRT-PCR扩增, 采用Quantitation-comparative Ct(Livak)法即 $\Delta\Delta$ Ct法测定进行数据分析。所有引物定制于上海杰瑞生物工程有限公司。



1.2.7 染色质免疫共沉淀技术(chromatin immunoprecipitation, ChIP)

根据研究报道,Bmal1 作为转录因子可结合到目的基因的启动子 E-box 区域发挥调控作用<sup>[5]</sup>。本文通过生物信息学检索α1G、α1H 启动子上游 E-box 结合位点,使用 ChIP 检测观察 Bmal1 与 α1G、α1H 启动子的 E-box 区域结合情况。超声破碎细胞,加入 Bmal1 抗体,与靶蛋白-DNA 复合物相互结合,加入 ProteinA,结合抗体-靶蛋白-DNA 复合物,沉淀,洗脱,得到富集的靶蛋白-DNA 复合物,解交联,纯化富集的 DNA-片断,荧光定量 PCR 分析。

1.3 统计学方法

实验数据均采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )或百分比表示,用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析,计量资料结果之间分析使用 *t* 检验,计数资料结果之间分析使用卡方检验,通过 R statistical package (版本 2.12.1) 计算,使用 JTK-cycle 分析评估 Bmal1、α1G、α1H 节律性特征,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CHF 小鼠心脏收缩功能降低伴心肌肥厚及纤维化

与假手术对照组(CON)相比,CHF 组小鼠左室射血分数及左室缩短分数均明显降低,左室收缩末及舒张末内径明显扩张,具有统计学差异(*P* < 0.05, 表 1),且 PCR 检测心肌组织内心房钠尿肽(atrial natriuretic peptide, ANP),脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)明显升高(*P* < 0.05, 表 1),提示 CHF 组小鼠心脏收缩功能明显降低。图 1 为两组小鼠代表性心超图片。同时,CHF 组小鼠左室间隔部厚度及左室质量均明显增加(*P* < 0.05, 表 1),心肌细胞横断面(cross-sectional area, CSA)HE 染色提示 CHF 组心肌细胞明显增大(*P* < 0.05, 图 2B),提示 CHF 组小鼠心肌肥厚。上述结果表明,与 CON 组相比,CHF 组小鼠心脏收缩功能明显下降并伴有心肌肥厚。

与 CON 组相比,Masson 染色提示 CHF 组小鼠心脏纤维组织明显增多(*P* < 0.05, 图 2C)。α-SMA 和 Gal-3 是与心脏纤维化密切相关的分子蛋白。IHC 染色显示,与 CON 组相比,α-SMA 及 Gal-3 在 CHF 组小鼠心脏中表达明显升高(*P* < 0.05, 图 2D~E),表明 CHF 组小鼠心肌纤维化显著增多。图 2A 为心脏切片染色代表性图片。

2.2 CHF 小鼠心脏中 TTCC 表达量增高

对 CON 及 CHF 组小鼠心肌两种 TTCC 亚型(α

表 1 对照组与心衰组小鼠心超数据及心衰参数比较  
Table 1 Data comparison of echocardiography and heart failure between CON group and CHF group  
( $\bar{x} \pm s$ )

指标	CON 组(n=12)	CHF 组(n=12)
心率(次/min)	512.44 ± 35.13	504.04 ± 44.14
左室射血分数(%)	67.49 ± 4.87	51.27 ± 8.04*
左室质量(mg)	106.84 ± 9.03	203.28 ± 50.08*
左室缩短分数(%)	44.77 ± 4.33	25.37 ± 6.01*
左室收缩末内径(mm)	1.82 ± 0.18	2.95 ± 0.58*
左室舒张末内径(mm)	3.30 ± 0.12	3.92 ± 0.51*
左室后壁厚度(mm)	1.34 ± 0.08	1.33 ± 0.16
左室间隔厚度(mm)	0.88 ± 0.07	1.25 ± 0.17*
ANP(mRNA 相对表达量)	1.00 ± 0.04	3.64 ± 0.19*
BNP(mRNA 相对表达量)	1.00 ± 0.06	4.07 ± 0.17*

与 CON 组比较,\**P* < 0.05。

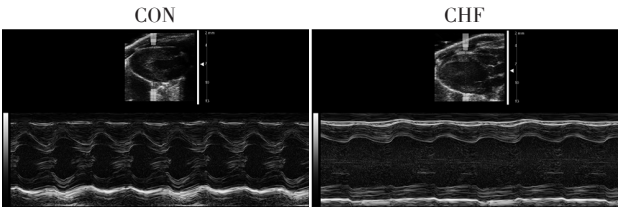


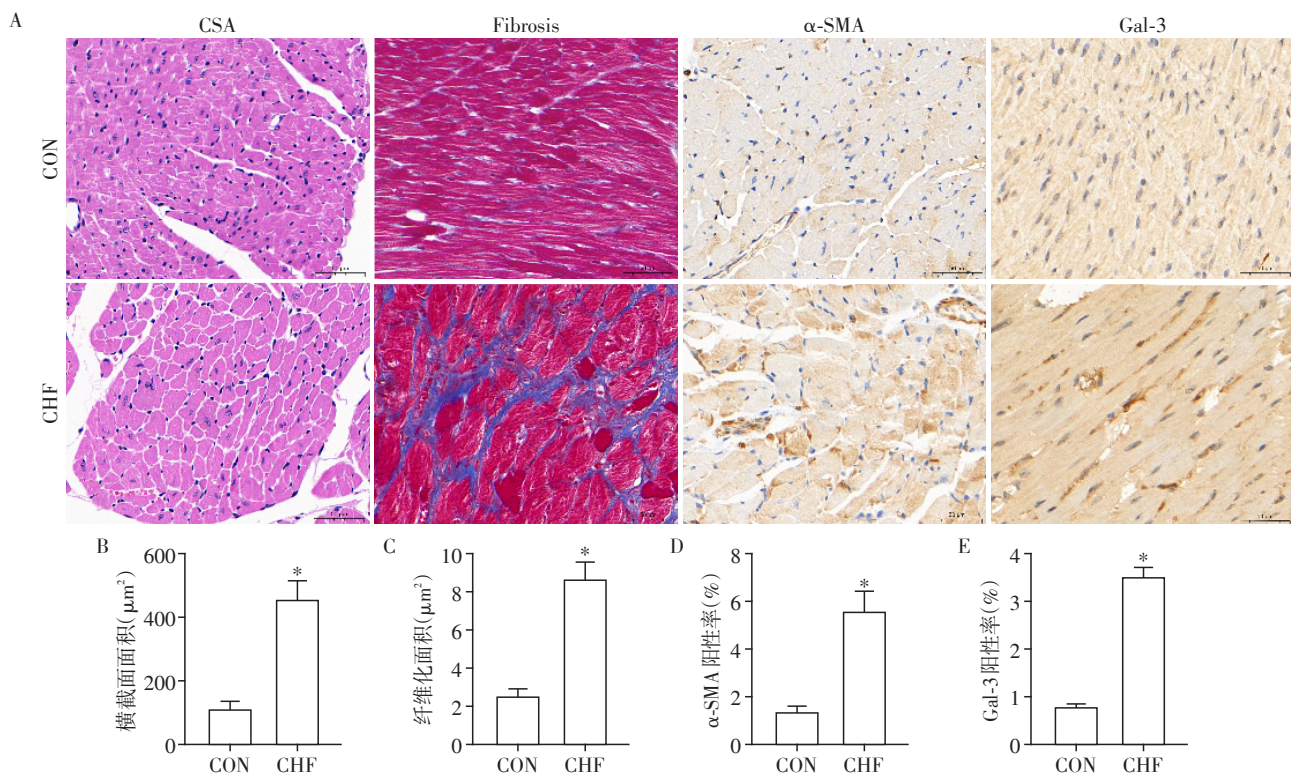
图 1 CON 组与 CHF 组小鼠代表性的超声心动图图片  
Figure 1 Representative echocardiography results in CON group and CHF group

1G、α1H)行 IHC 及 Western blot 检测(图 3)。与 CON 组相比,CHF 组 α1G 及 α1H 染色阳性面积明显增加,蛋白表达水平显著增高。结果提示,在 CON 组小鼠心肌中,TTCC 表达量很低,CHF 小鼠心肌中,TTCC 表达明显增高。

2.3 CHF 小鼠 VA 发作率明显增高与 TTCC 表达增高有关

分别在 CT0 和 CT12 时间点对小鼠心脏进行离体电刺激诱发 VA。标准刺激程序和 VA 发作的典型图片见图 4A。在 CT0 时间点行 PES,CON 组诱发出 1 例心室颤动,VA 发生率为 10%;CHF 组诱发出 2 例室性心动过速,5 例心室颤动,2 例同时诱发出室性心动过速和心室颤动,VA 发生率为 90%;CHF+MIB 组诱发出 3 例心室颤动,VA 发生率为 30%。在 CT12 时间点行 PES,CON 组未诱发出 VA;CHF 组诱发出 1 例心室颤动,3 例同时诱发出室性心动过速和心室颤动,VA 发生率为 40%;CHF+MIB 组诱发出 2 例心室颤动,CHF+MIB 组 VA 发生率为 20%。以上结果提示,CHF 组小鼠在上述两个时间点的 VA 发生率均明显高于 CON 组(*P* < 0.05, 图 4B)。使用 TTCC 阻滞剂米贝拉地尔(MIB)后,和 CHF 小鼠相比,治疗

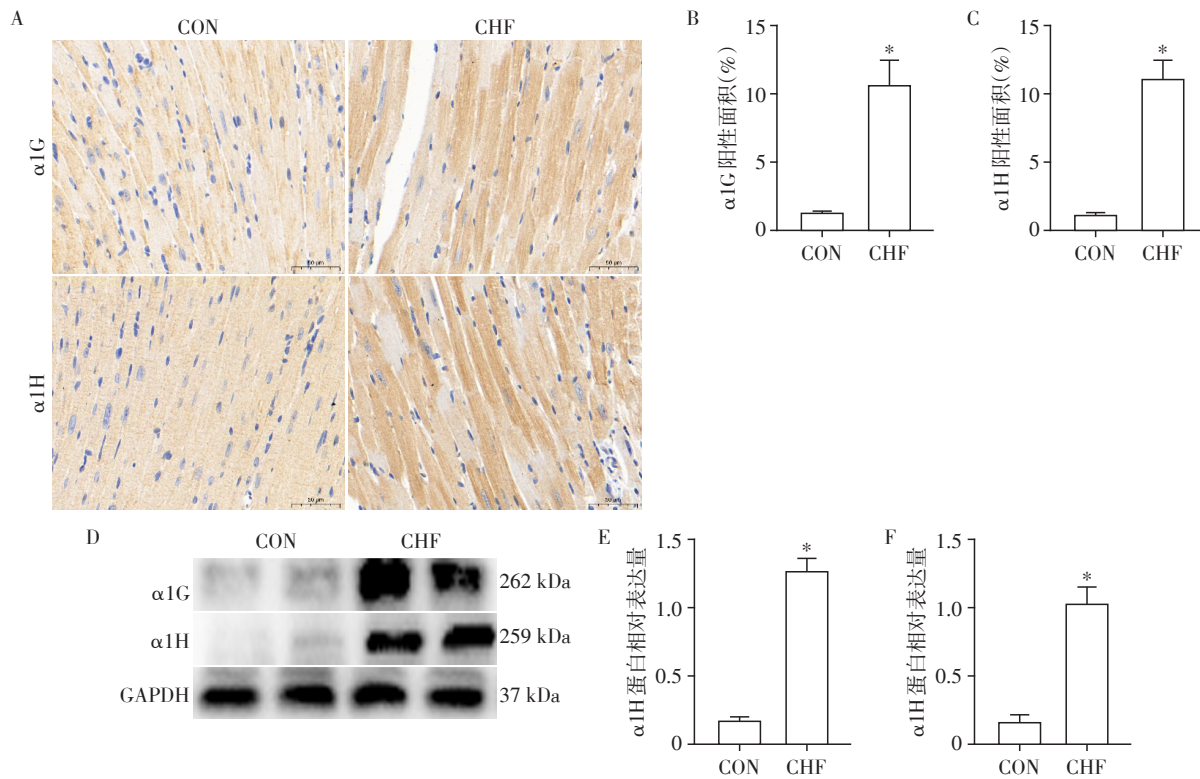




A: 心脏切片 HE 染色, Masson 染色、 $\alpha$ -SMA 和 Gal-3 蛋白 IHC 染色的典型图片( $\times 630$ ); B~E: 分别为心肌细胞横截面面积, 纤维化面积,  $\alpha$ -SMA 和 Gal-3 染色阳性面积定量分析。与 CON 组比较,  $^*P < 0.05 (n = 6)$ 。

图2 CON组与CHF组小鼠心脏组织病理生理学的变化比较

Figure 2 Comparison of cardiac pathophysiological changes between CON group and CHF group



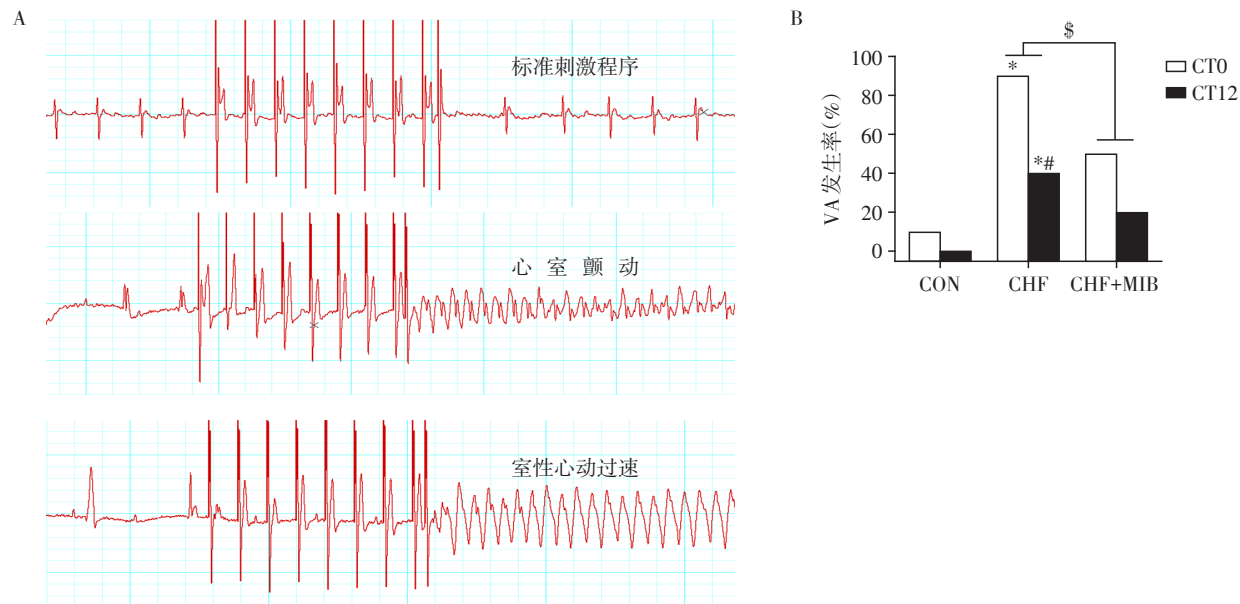
A: TTCC 通道心脏组织染色典型图片( $\times 630$ ); B、C: TTCC 离子通道阳性面积定量分析; D~F: TTCC 蛋白典型条带及蛋白灰度值定量分析。与 CON 组比较,  $^*P < 0.05 (n = 6)$ 。

图3 CON组与CHF组小鼠心肌T型钙离子通道两种亚型( $\alpha 1G$ 和 $\alpha 1H$ )的变化比较

Figure 3 Comparison of TTCC ( $\alpha 1G$  and  $\alpha 1H$ ) changes in myocardium between CON group and CHF group

组小鼠(CHF+MIB)在CT0+CT12两时间点VA的总发生率明显下降( $P<0.05$ ,图4B)。在3组小鼠中,CT0时间点VA的发生率均高于CT12,在CHF组小鼠中有统计学差异( $P<0.05$ ,图4B),提示在慢性心衰小鼠中,VA发生率有昼夜差异。以上结果表明,在CHF小鼠中,VA发生率明显增加,且存在昼夜节律差异,使用MIB后VA发生率明显减少。

2.4 CHF小鼠心脏TTCC及Bmal1表达具有昼夜节律  
收取48 h CHF小鼠左心室组织标本,使用Western blot及qRT-PCR检测心肌组织TTCC( $\alpha 1G$ ,  $\alpha 1H$ )及Bmal1节律表达情况。在48 h内,JKT cycle分析提示CHF组小鼠的TTCC( $\alpha 1G$ ,  $\alpha 1H$ )及Bmal1蛋白表达均有节律性变化( $P<0.05$ ,图5B~D),其周期及相位一致,周期为24,相位为0。JKT cycle分析



A:程序性电刺激典型图片;B:各组VA发生率统计图,CHF小鼠VA发生率明显增加,且有昼夜差异,使用MIB后,总VA发生率(CT0+CT12)较CHF组明显降低。与CON中相同时间点比较,\* $P<0.05$ ;与CHF中CT0组比较,\* $P<0.05$ ;CHF(CT0+CT12)与CHF+MIB(CT0+CT12)比较,\* $P<0.05$ ( $n=10$ )。

图4 CON组、CHF组及CHF+MIB组VA发生率及节律变化的比较

Figure 4 Comparison of VA incidence and rhythm changes between CON group, CHF group and CHF + MIB group

qRT-PCR结果提示,TTCC( $\alpha 1G$ ,  $\alpha 1H$ )及Bmal1 mRNA亦有节律性变化( $P<0.05$ ,图5E~G),其周期一致,均为24,但相位不同,TTCC为20,Bmal1为0。因Bmal1作为转录因子,调控下游转录可能存在延迟,所以TTCC表达的节律性可能与Bmal1节律表达有关。

2.5 Bmal1直接参与调控T型钙离子通道转录

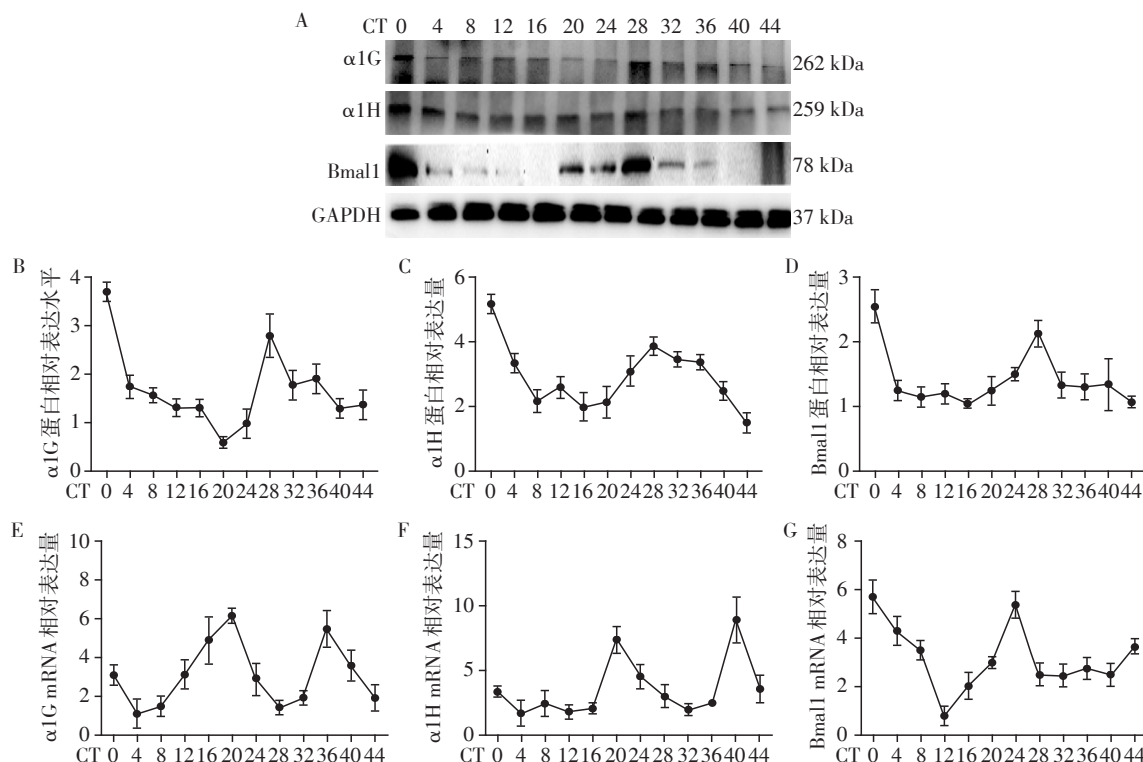
ChIP结果显示,Bmal1与 $\alpha 1G$ 、 $\alpha 1H$ 和阳性参照组(PP)启动子区域结合的富集指数相对于阴性参照组(PN)明显增加,具有统计学差异( $P<0.05$ ,图6B~C)。同时使用IgG作为阴性对照,排除启动子区域的非特异性结合。以上结果提示,Bmal1可通过与TTCC启动子区域的E-box位点结合从而调控其转录。

3 讨论

本研究主要发现,在CHF小鼠中,TTCC( $\alpha 1G$ ,  $\alpha$

1H)通道重新高表达且呈昼夜节律性变化。使用PES诱导CHF小鼠VA发作,提示VA发生率与TTCC( $\alpha 1G$ ,  $\alpha 1H$ )重新高表达有关,使用TTCC阻滞剂可减少CHF小鼠VA的发作。本研究第一次发现,Bmal1作为转录因子可直接结合在TTCC( $\alpha 1G$ ,  $\alpha 1H$ )启动子区域的E-box位点,启动TTCC转录。

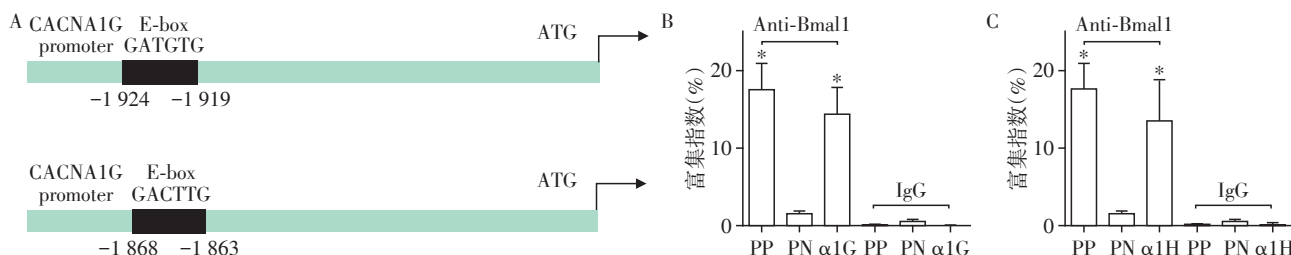
慢性心力衰竭是各种心脏疾病的严重表现或晚期阶段,死亡率和再住院率居高不下,给患者、家庭及社会造成了严重的经济负担<sup>[15]</sup>。国内一项对10 714例住院心衰患者的调查数据显示,1980、1990、2000年心衰患者住院期间死亡率分别为15.4%、12.3%和6.2%,心衰患者死亡原因依次为泵衰竭(59%)、心律失常(13%)和心脏性猝死(13%)<sup>[16]</sup>。因此,VA/SCD是心力衰竭病人死亡的主要原因之一<sup>[3, 15-16]</sup>。在本研究中,和正常对照组(CON)相比,CHF小鼠心脏呈心衰表现(心肌细胞体积增大,纤维化增多,EF值降低),程序性电刺激后CHF小鼠



A: Western blot 蛋白条带典型图片; B~D: 分别为 $\alpha 1G$ 、 $\alpha 1H$ 及 Bmal1 蛋白灰度值定量分析, JKT cycle 分析提示蛋白表达有节律性(所有  $P < 0.05$ ); E~G: 分别为 $\alpha 1G$ 、 $\alpha 1H$ 及 Bmal1 的 mRNA 表达定量分析, JKT cycle 分析提示 mRNA 表达有节律性(所有  $P < 0.05$ )。每组  $n=3$ 。

图5 CHF小鼠心肌组织 TTCC( $\alpha 1G$ 、 $\alpha 1H$ )及 Bmal1 表达具有昼夜节律性

Figure 5 Expression of TTCC( $\alpha 1G$ ,  $\alpha 1H$ ) and Bmal1 in myocardium of CHF mice showed circadian rhythm



A:  $\alpha 1G$ 和 $\alpha 1H$ 启动子上游 E-box 结合位点示意图, 黑色标注为 E-box 位点, 箭头标注为转录起始位点; B、C: Bmal1 与启动子区域结合富集指数统计图, IgG 为阴性对照, 排除启动子区域的非特异性结合, PP: Bmal1 结合在 PER1 启动子上游的 E-box 位点, 为阳性参照组, PN: PER1 启动子上游区域 Bmal1 非结合位点, 为阴性参照组,  $\alpha 1G$ : 启动子-1919 bp 附近区域, Bmal1 可能结合的 E-box 位点,  $\alpha 1H$ : 启动子-1863 bp 附近区域, Bmal1 可能结合的 E-box 位点。与 PN 比较,  $^*P < 0.05$  ( $n=4$ )。

图6 染色质免疫共沉淀技术检测 Bmal1 与 T 型钙离子通道两种亚型( $\alpha 1G$ 和 $\alpha 1H$ )启动子区域的结合情况

Figure 6 The bindings of Bmal1 to promoter regions of TTCC ( $\alpha 1G$  and  $\alpha 1H$ ) detected by chromatin immunoprecipitation

VA 发生率明显增加, 这之前研究结果相符。目前研究报道, CHF 患者 VA/SCD 更常发生在清晨, 具有晨峰现象<sup>[17-18]</sup>, 且越来越多的证据表明这些心血管不良事件的昼夜节律性至少部分与内源性生物钟对离子通道的调控有关<sup>[4, 9, 19]</sup>。在 Jeyaraj 等<sup>[20]</sup>的研究中, 转录调节因子 Klf15 基因缺失或过表达都可导致心脏复极异常, 增强心脏 VA 发生的易感性。在心脏中, Bmal1 调控 Klf15 呈节律性表达, 这可能是导致 VA 发作具有时间点高发现象的原因之

一。在本研究中, 发现在 CHF 小鼠心脏中 Bmal1 及 TTCC 表达在 48 h 内有昼夜节律性, 蛋白表达水平在 CT0 时出现第一个峰值, 于是在 CT0 及其相对应的 CT12 两个时间点对小鼠心脏行离体程序性电刺激, 发现在 CHF 小鼠中, CT0 时间点 VA 的发生率明显高于 CT12, 表明心脏内源性生物钟参与了 VA 的发生。许多在动物和人类身上的实验证明, 细胞内钙调节失衡会增加细胞对 VA 的敏感性<sup>[21]</sup>。心肌细胞膜上存在两种电压门控  $Ca^{2+}$  通道: L 型  $Ca^{2+}$  通道



(LTCC)和T型 $\text{Ca}^{2+}$ 通道(TTCC)<sup>[10]</sup>。TTCC只有 $\alpha 1$ 一种亚基,包括 $\text{Ca}_v3.1(\alpha 1G)$ 、 $\text{Ca}_v3.2(\alpha 1H)$ 、 $\text{Ca}_v3.3(\alpha 1I)$ 3种亚型,其中心肌中仅表达 $\text{Ca}_v3.1(\alpha 1G)$ 和 $\text{Ca}_v3.2(\alpha 1H)$ <sup>[22]</sup>。在大多数哺乳动物胚胎期心脏中,TTCC在心房和心室肌细胞中明显表达,但出生后在心室肌细胞中表达量逐渐减少或不表达,仅在窦房结及传导系统中表达,参与心脏IV期的自动去极化<sup>[11]</sup>。然而,在许多病理条件下如心肌肥厚或者心力衰竭时,TTCC会再次重新表达,但其机制尚未阐释清楚<sup>[12-13]</sup>。在本实验中,TAC诱导的心衰小鼠中,免疫组化及Western blot结果提示 $\alpha 1G$ 和 $\alpha 1H$ 两种亚型表达水平较对照组(CON)明显升高,提示CHF小鼠心脏中TTCC重新高表达,同时VA发生率明显增加。在CHF小鼠使用TTCC阻滞剂米贝拉地尔(MIB)后,VA发生率明显下降。有研究报道,在病变心肌中TTCC重新高表达将增加心肌细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 内流,导致细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 超载和心律失常<sup>[14,23]</sup>。同时,也有研究发现, $\alpha 1H$ 在钙调磷酸酶/核因子病理性激活的T细胞信号的诱导中发挥关键作用,这也会增加心律失常的易感性<sup>[24-25]</sup>。Kinoshita等<sup>[14]</sup>研究中,TTCC阻滞剂可通过复极静息膜电位及改善心脏自主神经的平衡发挥抗心律失常作用。以上结果提示心衰中,VA发生增加与TTCC重新高表达有关。收集48 h CHF小鼠心脏组织行Western blot及qRT-PCR,发现心脏内源性Bmal1的表达依旧保留生物节律,TTCC亦存在昼夜节律,且在CT0表达量最高。因此,发现在心衰中,Bmal1可调控TTCC使其昼夜节律性表达,这与VA/SCD发作的昼夜节律相关。

本课题组既往研究显示心脏内源性生物钟可直接调控 $\beta 1$ -肾上腺素能受体( $\beta 1\text{-AR}$ ),在心脏中完整的Clock-Bmal1二聚体结构可通过与 $\beta 1\text{-AR}$ 的编码基因Adrb1启动子上游区域的E-box结合,直接调控 $\beta 1\text{-AR}$ 的表达<sup>[26]</sup>。所以,进一步验证Bmal1作为转录因子是否可以调控TTCC转录。ChIP结果显示,Bmal1可以直接结合至TTCC启动子区域的E-box位点,调控其转录,从而TTCC通道表达存在昼夜节律。本研究发现,当CHF时,TTCC通道重新高表达,通道开放将增加舒张期钙渗漏,导致细胞内钙超载,触发VA/SCD,这一变化受生物钟基因Bmal1直接调控从而使VA/SCD发作有昼夜节律现象。事实上,在人类和小鼠研究中发现,存在多个与VA有关且呈节律性表达的基因,如Calm2、Kcnh2、Scn5a、Cx43、Cx45等<sup>[21]</sup>。所以VA发作的昼夜时间差异很可能是由多个基因变化共同导致。

本研究的不足之处在于未能深入探究TTCC激活后生物钟基因与胞浆钙浓度变化的关联。在心脏,L型 $\text{Ca}^{2+}$ 通道含量丰富,负责大部分 $\text{Ca}^{2+}$ 进入细胞,是心肌细胞以钙释钙触发心肌收缩的主要钙离子通道,所以TTCC引起细胞内钙超载的作用大小仍需进一步研究。本实验研究中的动物为心肌肥厚伴心功能不全的模型,而早期心衰和失代偿期心衰的调控机制并不完全一致。生物钟基因在早期和晚期心衰中表达是否一致及调控机制目前仍未阐释清楚。此外,TTCC特异性抑制剂米贝拉地尔因存在严重的药物相互作用并未在临床中推广使用。有研究报道,恩格列净可通过抑制心脏 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交换降低心肌细胞胞质 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度,然而这类钠-葡萄糖共转运蛋白2(SGLT-2)抑制剂是否能够抑制TTCC尚未有研究报道,仍需进一步探讨<sup>[27]</sup>。

综上所述,本研究发现 CHF 手术小鼠中,TTCC通道重新高表达且呈昼夜节律性,使用TTCC阻滞剂可减少CHF小鼠VA/SCD的发作,且TTCC这一变化受生物钟基因Bmal1直接调控。

#### [参考文献]

- [1] ROSSIGNOL P, HERNANDEZ A F, SOLOMON S D, et al. Heart failure drug treatment [J]. Lancet, 2019, 393 (10175):1034-1044
- [2] TROMP J, TAY W T, OUWERKERK W, et al. Multimorbidity in patients with heart failure from 11 Asian regions: a prospective cohort study using the ASIAN-HF registry [J]. PLoS Med, 2018, 15(3):e1002541
- [3] SAOUR B, SMITH B, YANCY C W. Heart failure and sudden cardiac death [J]. Card Electrophysiol Clin, 2017, 9 (4):709-723
- [4] BLACK N, D' SOUZA A, WANG Y, et al. Circadian rhythm of cardiac electrophysiology, arrhythmogenesis, and the underlying mechanisms [J]. Heart rhythm, 2019, 16(2):298-307
- [5] XIONG W, LI J, ZHANG E, et al. BMAL1 regulates transcription initiation and activates circadian clock gene expression in mammals [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 473(4):1019-1025
- [6] TAKEDA N, MAEMURA K. The role of clock genes and circadian rhythm in the development of cardiovascular diseases [J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(17):3225-3234
- [7] SCHRODER E A, LEFTA M, ZHANG X, et al. The cardiomyocyte molecular clock, regulation of Scn5a, and arrhythmia susceptibility [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2013, 304(10):C954-965
- [8] SCHRODER E A, BURGESS D E, ZHANG X, et al. The

- cardiomyocyte molecular clock regulates the circadian expression of *Kcnh2* and contributes to ventricular repolarization[J]. *Heart Rhythm*, 2015, 12(6):1306-1314
- [9] CHEN Y, ZHU D, YUAN J, et al. CLOCK-BMAL1 regulate the cardiac L-type calcium channel subunit CACNA1C through PI3K-Akt signaling pathway [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2016, 94(9):1023-1032
- [10] CLOZEL J P, ERTEL E A, ERTEL S I. Voltage-gated T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels and heart failure [J]. *Proc Assoc Am Physicians*, 1999, 111(5):429-437
- [11] VASSORT G, TALAVERA K, ALVAREZ J L. Role of T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the heart [J]. *Cell Calcium*, 2006, 40(2):205-220
- [12] NUSS H B, HOUSER S R. T-type  $\text{Ca}^{2+}$  current is expressed in hypertrophied adult feline left ventricular myocytes [J]. *Circ Res*, 1993, 73(4):777-782
- [13] MARTÍNEZ M L, HEREDIA M P, DELGADO C. Expression of T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in ventricular cells from hypertrophied rat hearts [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1999, 31(9):1617-1625
- [14] KINOSHITA H, KUWAHARA K, TAKANO M, et al. T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockade prevents sudden death in mice with heart failure [J]. *Circulation*, 2009, 120(9):743-752
- [15] MCDONAGH T A, METRA M, ADAMO M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure [J]. *Eur Heart J*, 2021, 42(36):3599-3726
- [16] 中华医学会心血管病学分会. 中国部分地区1980、1990、2000年慢性心力衰竭住院病例回顾性调查[J]. *中华心血管病杂志*, 2002, 30(8):450-454
- [17] DIEKMAN C O, WEI N. Circadian rhythms of early afterdepolarizations and ventricular arrhythmias in a cardiomyocyte model [J]. *Biophys J*, 2021, 120(2):319-333
- [18] MAAN A, SHERFESEE L, LEXCEN D, et al. Diurnal, seasonal, and monthly variations in ventricular arrhythmias in patients with implantable cardioverter-defibrillators [J]. *JACC Clin Electrophysiol*, 2019, 5(8):979-986
- [19] SCHRODER E A, BURGESS D E, ZHANG X, et al. The cardiomyocyte molecular clock regulates the circadian expression of *Kcnh2* and contributes to ventricular repolarization [J]. *Heart Rhythm*, 2015, 12(6):1306-1314
- [20] JEYARAJ D, HALDAR S M, WAN X, et al. Circadian rhythms govern cardiac repolarization and arrhythmogenesis [J]. *Nature*, 2012, 483(7387):96-99
- [21] HAYTER E A, WEHRENS S M T, VAN DONGEN H P A, et al. Distinct circadian mechanisms govern cardiac rhythms and susceptibility to arrhythmia [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1):2472
- [22] PEREZ-REYES E. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels [J]. *Physiol Rev*, 2003, 83(1):117-161
- [23] LALEVÉ N, REBSAMEN M C, BARRÈRE-LEMAIRE S, et al. Aldosterone increases T-type calcium channel expression and *in vitro* beating frequency in neonatal rat cardiomyocytes [J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 67(2):216-224
- [24] CHIANG C S, HUANG C H, CHIENG H, et al. The  $\text{Ca}_v3.2$  T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel is required for pressure overload-induced cardiac hypertrophy in mice [J]. *Circ Res*, 2009, 104(4):522-530
- [25] KHOO M S C, LI J, SINGH M V, et al. Death, cardiac dysfunction, and arrhythmias are increased by calmodulin kinase II in calcineurin cardiomyopathy [J]. *Circulation*, 2006, 114(13):1352-1359
- [26] WANG Y, YUAN J, QIAN Z, et al.  $\beta_2$  adrenergic receptor activation governs cardiac repolarization and arrhythmogenesis in a guinea pig model of heart failure [J]. *Sci Rep*, 2015, 5:7681
- [27] 魏 晗, 辛小军, 王 曼, 等. SGLT-2抑制剂改善糖尿病患者心血管疾病预后的研究进展 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(5):773-778

[收稿日期] 2022-02-29

(本文编辑:唐 震)