

Bmal1敲除对糖尿病微血管内皮依赖性舒张功能的影响及机制

刘桂君^{1*}, 戴红艳^{2#}

¹青岛大学, 山东 青岛

²青岛市市立医院, 山东 青岛

收稿日期: 2022年6月19日; 录用日期: 2022年7月11日; 发布日期: 2022年7月21日

摘要

目的: 探究生物钟基因Bmal1敲除对糖尿病微血管内皮依赖性舒张功能(EDR)的影响及机制。方法: 对Bmal1全基因敲除(Bmal1^{-/-})的小鼠和野生型(WT)小鼠进行糖尿病造模, 后从糖尿病造模成功的小鼠(DM)和造模对照组(Ctr)抽出Bmal1^{-/-} + DM、Bmal1^{-/-} + Ctr、WT + DM、WT + Ctr各5只, 构成4个分组进行后续实验, 血管张力仪测量4组小鼠肠系膜动脉血管段的EDR, Western blot检测血管内皮细胞中Bmal1及PPAR δ 通路蛋白的表达水平。结果: WT + DM组的EDR差于WT + Ctr组($P < 0.05$), 但好于Bmal1^{-/-} + DM组($P < 0.01$); Bmal1^{-/-} + Ctr组和WT + Ctr组对比, Bmal1^{-/-} + DM组和WT + DM组对比, Bmal1、PPAR δ 、DHFR的表达都是减少的($P < 0.01$), eNOS的解偶联是增加的($P < 0.01$)。结论: 糖尿病可引起微血管的EDR受损, Bmal1的敲除可加重糖尿病微血管的EDR损伤, PPAR δ 介导了Bmal1对EDR的影响。

关键词

糖尿病, 微血管, 生物钟, Bmal1, 血管内皮依赖性舒张功能

Effect and Mechanism of Bmal1 Knockout on Diabetic Microvascular Endothelium-Dependent Relaxation Function

Guijun Liu^{1*}, Hongyan Dai^{2#}

¹Qingdao University, Qingdao Shandong

*第一作者。

#通讯作者。

Abstract

Objective: To explore the effect and mechanism of circadian clock gene *Bmal1* knockout on diabetic microvascular endothelium-dependent relaxation (EDR). **Methods:** Inducing diabetes mellitus in *Bmal1* knockout (*Bmal1*^{-/-}) mice and wild-type (WT) mice, then choosing mice from diabetic mice (DM) and the control group (Ctr) to constitute 4 groups, *Bmal1*^{-/-} + DM, *Bmal1*^{-/-} + Ctr, WT + DM, WT + Ctr, each of 5 mice. The EDR of the mesenteric artery segments of the mice in the 4 groups was measured by vascular tensiometer, the expression levels of *Bmal1* and PPAR δ pathway proteins in vascular endothelial cells were tested by Western blot. **Results:** The EDR of the WT + DM group was worse than that of the WT + Ctr group ($P < 0.05$) but better than that of the *Bmal1*^{-/-} + DM group ($P < 0.01$). Compared the *Bmal1*^{-/-} + DM to the WT + DM group, compared the *Bmal1*^{-/-} + Ctr to the WT + Ctr group, the expression levels of *Bmal1*, PPAR δ , and DHFR were all decreased ($P < 0.01$), and the uncoupling of eNOS was increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** Diabetes can cause damage to the EDR of microvascular, and the knockout of *Bmal1* can aggravate the EDR damage of diabetic microvascular, PPAR δ mediates the effects of *Bmal1* on EDR.

Keywords

Diabetes, Microvascular, Circadian Clock, *Bmal1*, Endothelium-Dependent Relaxation Function

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一种呈现高血糖状态的代谢紊乱疾病,是当今世界发病率最高的慢性病之一,糖尿病微血管病变是糖尿病最常见的并发症,也是糖尿病致死致残的主要原因[1]。血管内皮依赖性舒张(endothelium-dependent relaxation, EDR)是血管舒张功能的重要组成,对血管内的血液灌注有着直接影响。生物钟是体内的时间测量装置,对觉醒以及体内代谢有着广泛调控,脑和肌肉芳香烃受体核转样蛋白 1 (brain and muscle arnt-like 1, *Bmal1*)是最具代表性的生物钟基因[2]。过氧化物酶体增殖生物激活受体 δ (peroxisome proliferators-activated receptor δ , PPAR δ)是哺乳动物细胞内的一种核受体,影响多种蛋白的转录,研究发现 PPAR δ 可通过影响二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase, DHFR)的表达来影响内皮型一氧化氮合成酶(endothelial nitric oxide synthases, eNOS)的解偶联,对血管的 EDR 产生影响[3]。近年来有研究报道 *Bmal1* 基因敲除小鼠体内 PPAR δ 的表达降低[4]。

糖尿病微血管病变常累积心脏、脑、视网膜、肾脏等各处器官,对糖尿病患者的生存质量带来很大影响,而生物钟紊乱也是心脑血管疾病的重要危险因素,通过对 *Bmal1* 的研究,可进一步探讨生物钟系统对微血管系统的影响[5] [6]。由于微血管位置深直径小,难以取材,目前尚无完美的动物模型,国内外实验中常用小鼠的肠系膜动脉二级分支作为微血管的研究载体[7] [8]。本实验选用了 *Bmal1* 全基因敲除的小鼠为研究对象,进行糖尿病造模,探究生物钟基因 *Bmal1* 敲除对糖尿病微血管 EDR 的影响。在前期

的实验中, 我们发现了 *Bmal1* 敲除可以影响糖尿病微血管 EDR, 结合之前的研究, 提出实验假设: *Bmal1* 可以通过调控 *PPAR δ* 的表达, 来影响 *PPAR δ* 通路下游 DHFR、eNOS 的表达, 增加 eNOS 的解偶联, 来影响 EDR。通过提取糖尿病微血管内皮细胞, 再用 Western blot 的方法检测蛋白表达量, 对假设进行验证。

2. 材料和方法

2.1. 实验动物

实验所用的雄性 *Bmal1* 全基因敲除小鼠(*Bmal1*^{-/-})和同批次野生型小鼠(WT)购自北京唯尚立德生物科技有限公司。饲养环境: 温度 20°C~25°C, 普通饲料, 自由摄食饮水, 12 h/12h 昼夜明暗交替。实验通过青岛市市立医院伦理委员会审批。

2.2. 试剂与仪器

血管张力仪 DMT620M (丹麦 DMT); 血糖仪(瑞士罗氏); 体视显微镜(南京江南); 链脲佐菌素 STZ、柠檬酸钠、胶原酶 I (美国 Sigma); CD31、ICAM2 抗体(美国 BD); 磁珠二抗(美国 Thermo Fisher); *Bmal1*、*PPAR δ* 、DHFR、eNOS、GAPDH 抗体(英国 Abcam); 羊抗兔二抗、RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒(北京索莱宝)、ECL 发光试剂盒(南京诺唯赞)。

Krebs 液配方(mmol/l): 氯化钠 120, 氯化钾 5, 硫酸镁 1.2, 磷酸二氢钾 1.2, 碳酸氢钠 3.25, 葡萄糖 11.1, 氯化钙 2.5。(中国国药)

2.3. 糖尿病造模

选取 8 周龄 *Bmal1*^{-/-}小鼠和 WT 小鼠, 采用低剂量链脲佐菌素(STZ, 50 mg/kg, 溶于柠檬酸钠缓冲液)连续腹腔注射 5 天, 对照组同时注射 5 天柠檬酸钠缓冲液[9]。2 周后检测血糖含量, 以随机血糖 > 16.7 mM 为糖尿病成模标准(DM) [9] [10]。

2.4. 实验分组及取材

在糖尿病造模成功后, 选取糖尿病状态(DM)的 *Bmal1*^{-/-}小鼠和 WT 小鼠各 5 只, 只注射缓冲液的非糖尿病(Ctr)的 *Bmal1*^{-/-}小鼠和 WT 小鼠各 5 只, 共分为 4 组: 糖尿病的 *Bmal1*^{-/-}组(*Bmal1*^{-/-} + DM), 非糖尿病的非糖尿病 *Bmal1*^{-/-}组(*Bmal1*^{-/-} + Ctr), 糖尿病的 WT 组(WT + DM), 非糖尿病的 WT 组(WT + Ctr), $n = 5$ 。

注射 STZ 后 18 周时, 在戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉后解剖, 分离肠系膜二级动脉用于 EDR 检测和内皮细胞提取。

2.5. 内皮依赖性舒张功能(EDR)检测

取小鼠肠系膜动脉 2 mm, 安装于张力测量仪, 并给每个容器加入 5 ml Krebs 溶液, 给予 95%氧气和 5%二氧化碳混合气体通入, 37°C 平衡 60 分钟, 将仪器标准化, 用 60 mM 氯化钾收缩血管环并用 Krebs 溶液冲洗, 再用苯肾上腺素(PE, 1 μ M)产生稳定的收缩, 并累积添加乙酰胆碱(ACh, 10⁻⁹ M 至 10⁻⁵ M)以诱导内皮依赖性舒张[3]。(1 M = 1 mol/L)

2.6. 内皮细胞提取

先用磁珠包被 CD31 抗体和 CAM2 抗体, 将小鼠的肠系膜动脉剪碎, 用胶原酶 I 消化, 20G 的针头吹打分离细胞团块。将细胞悬浮液与磁珠包被的 CD31 抗体混合孵育, 置于磁力架上对内皮细胞进行分离。同样方法再用磁珠包被的 ICAM2 抗体二次分离, 就得到较纯的内皮细胞[11]。

2.7. Western Blot 检测 Bmal1 蛋白的表达水平

用 RIPA 裂解液提取内皮细胞的蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。用 PAGE 凝胶试剂盒制胶, 每孔 30 μg 蛋白样品, 经电泳、转膜、封闭后, 加入 Bmal1 (1:1000)、PPAR δ (1:3000)、DHFR (1:5000)、eNOS (1:5000)、GAPDH (1:5000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜。次日 TBST 洗膜, 加入羊抗兔二抗(1:5000)孵育后, 经化学发光显影, 用 Image J 计算灰度值, 分析蛋白的相对表达水平。

2.8. 统计学处理

应用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析, 计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。血糖和蛋白表达结果中多组数据比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 两组之间比较用 Tukey 法。内皮依耐性舒张功能(EDR)的多组数据比较采用双因素重复测量方差分析(Two-way Repeated-Measures ANOVA), 双因素为分组和 ACh 浓度, 两组之间比较用 Bonferroni 法分析[3]。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 各组小鼠的一般情况

在糖尿病造模前, Bmal1 基因敲除(Bmal1 $^{-/-}$)的小鼠和同批次野生型(WT)小鼠相比, 血糖无明显差异 ($P > 0.05$), Bmal1 $^{-/-}$ 组的毛色也稍暗淡。在开始造模以后, 可见注射 STZ 的小鼠出现饮水、排尿、进食量增加的症状, 体重增长缓慢, 毛色明显暗淡, 活动量减少, 垫料味道较大, 而只注射柠檬酸钠缓冲液的小鼠未出现此类症状。在注射 STZ 的小鼠中, 8 只 Bmal1 $^{-/-}$ 小鼠全部成模(Bmal1 $^{-/-}$ + DM, 随机血糖 $> 16.7 \text{ mmol/L}$), 10 只 WT 小鼠成模 9 只(WT + DM, 随机血糖 $> 16.7 \text{ mmol/L}$), 1 只造模失败(血糖不达标, 不用于后续实验)。在只注射柠檬酸钠缓冲液的小鼠中, 8 只 Bmal1 $^{-/-}$ 小鼠和 10 只 WT 小鼠随机血糖与注射前无明显上升(Bmal1 $^{-/-}$ + Ctr, WT + Ctr, 随机血糖 $< 16.7 \text{ mmol/L}$)。造模过程中小鼠均未出现意外死亡。由于 Bmal1 $^{-/-}$ 小鼠的繁育困难, 所以用于前期糖尿病造模的 Bmal1 $^{-/-}$ 小鼠稍少于 WT 小鼠, 在造模后为了平衡各组入组数量, 选出部分小鼠进行此次实验, 剩余小鼠用于其他相关研究。

选出糖尿病的 Bmal1 $^{-/-}$ 小鼠(Bmal1 $^{-/-}$ + DM)、糖尿病的 WT 小鼠(WT + DM)、非糖尿病的 Bmal1 $^{-/-}$ 小鼠(Bmal1 $^{-/-}$ + Ctr)、非糖尿病的 WT 小鼠(WT + Ctr)各 5 只, 构成 4 个实验分组($n = 5$), 进行此次试验。

为了确认糖尿病造模效果, 并尽可能减少误差, 在糖尿病造模第 4、5、6 周时测三次随机血糖, 对三次血糖进行合并分析, 四组小鼠之间血糖的差异有统计学意义($F = 1997.00, P < 0.01$), Bmal1 $^{-/-}$ + DM 组血糖(26.36 ± 1.00)高于 Bmal1 $^{-/-}$ + Ctr 组($9.57 \pm 0.79, P < 0.01$), WT + DM 组血糖(27.05 ± 0.94)高于 WT + Ctr 组($9.81 \pm 0.63, P < 0.01$), 且 Bmal1 $^{-/-}$ + DM 组和 WT + DM 组随机血糖都大于 16.7 mmol/L , 证明入组的小鼠是符合实验要求的(表 1)。

Table 1. Comparison of three random blood sugars of mice in each group ($n = 5, \text{mmol/L}, \bar{x} \pm s$)

表 1. 各组小鼠三次随机血糖的比较($n = 5, \text{mmol/L}, \bar{x} \pm s$)

分组	第 4 周	第 5 周	第 6 周
Bmal1 $^{-/-}$ + DM*	25.60 \pm 0.83	26.58 \pm 0.66	26.90 \pm 0.89
Bmal1 $^{-/-}$ + Ctr	9.46 \pm 0.80	9.60 \pm 0.94	9.64 \pm 0.44
WT + DM#	26.66 \pm 0.76	27.22 \pm 0.90	27.28 \pm 0.93
WT + Ctr	9.98 \pm 0.34	9.20 \pm 0.32	10.24 \pm 0.54

注: 四组比较, $F = 1997.00, P < 0.01$ 。与 Bmal1 $^{-/-}$ + Ctr 组相比, * $q = 76.33, P < 0.01$; 与 WT + Ctr 组相比, # $q = 78.39, P < 0.01$ 。

3.2. 各组血管的内皮依赖性舒张功能(EDR)比较

血管环被肾上腺素(PE)诱导收缩时, 张力达到峰值(PE 峰), 再用不同浓度的 ACh 诱导出内皮依赖性舒张(EDR), 每个 ACh 浓度对应一个舒张度, 和 PE 峰形成百分比关系(%PE 峰), 作为评价 EDR 的指标。

各组血管在梯度浓度 ACh 诱导的舒张资料: 见表 2。使用双因素重复测量方差分析, 数据不符合球形检验假设($P < 0.05$), 选用 Greenhouse-Geisser 法校正, 结果显示分组差异、ACh 浓度差异以及交互作用都有统计学意义($P < 0.05$), 见表 3。对分组因素进行多重比较, WT + DM 组的 EDR 是差于 WT + Ctr 组的($P < 0.05$), 但好于 Bmal1^{-/-} + DM 组($P < 0.01$), 见表 4 和图 1。

Table 2. Comparison of the relaxation of vascular in each group in the gradient concentration ACh ($n = 5$, %PE 峰, $\bar{x} \pm s$)
表 2. 各组血管在梯度浓度 ACh 环境下的舒张情况对比($n = 5$, %PE 峰, $\bar{x} \pm s$)

分组	ACh				
	10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁵ M
Bmal1 ^{-/-} + DM	10.58 ± 3.04	33.54 ± 5.76*	59.30 ± 7.49*	82.21 ± 6.10*	87.24 ± 7.66
Bmal1 ^{-/-} + Ctr	17.48 ± 5.28	45.23 ± 4.94*	72.90 ± 2.49	87.59 ± 2.53	91.87 ± 1.41
WT + DM	18.18 ± 7.65	58.18 ± 4.33	83.10 ± 4.17	93.29 ± 2.46	94.11 ± 3.25
WT + Ctr	16.88 ± 3.77	65.69 ± 8.35	88.86 ± 5.36	97.86 ± 0.91	98.83 ± 0.66

注: 与 WT + DM 组比较, * $P < 0.05$ 。

Table 3. Repeated-measures variance analysis of the four groups vascular relaxation in the gradient concentration ACh
表 3. 各组血管在梯度浓度 ACh 环境下舒张情况的重复测量方差分析

变异来源	校正法	自由度	III 型平方和	均方	F	P
分组	-	3	5151.380	1717.127	69.760	<0.001
ACh 浓度	Greenhouse-Geisser	2.856	83432.503	29216.781	859.824	<0.001
分组* ACh 浓度	Greenhouse-Geisser	8.567	1623.067	189.458	5.576	<0.001

注: Mauchly's 球形检验, $P < 0.05$, 选用 Greenhouse-Geisser 法校正。

Table 4. Multiple comparisons of grouping factors for vasodilation (partial data)
表 4. 血管舒张情况的分组因素的多重比较(部分数据)

(I)分组	(J)分组	平均值差值 (I-J)	标准误差	P	95%置信区间	
					下限	上限
	WT + Ctr	-4.255	1.403	0.048	-8.477	-0.034
WT + DM	Bmal1 ^{-/-} + Ctr	6.354*	1.403	0.002	2.132	10.575
	Bmal1 ^{-/-} + DM	14.796	1.403	<0.001	10.575	19.018

3.3. 各组小鼠肠系膜动脉内皮细胞中 Bmal1 及 PPAR δ 通路蛋白的表达情况。

通过磁珠分选的方法提取小鼠肠系膜动脉内皮细胞, 检测各组内皮细胞中 Bmal1 及 PPAR δ 通路蛋白(PPAR δ , DHFR, eNOS)的表达, 其中 eNOS 有二聚体(dimer)和单体(monomer)两种状态, 二者比值增加代表 eNOS 偶联增加, 比值减小代表 eNOS 解偶联增加。

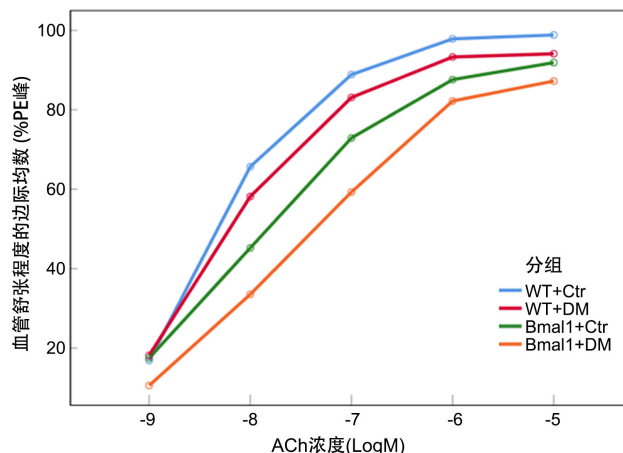
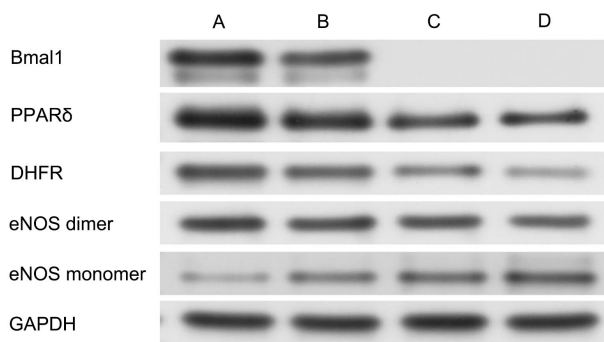


Figure 1. Interaction profile plot of grouping factor and ACh concentration factor

图 1. 分组因素和 ACh 浓度因素的交互轮廓图

Bmal1^{-/-} + Ctr 组和 WT + Ctr 组对比, Bmal1^{-/-} + DM 组和 WT + DM 组对比, Bmal1、PPAR δ 、DHFR 的表达都是减少的($P < 0.01$), eNOS 的解偶联是增加的。Bmal1^{-/-} + DM 组和 Bmal1^{-/-} + Ctr 组对比, Bmal1 的表达量极低, 且差异无统计学意义($P > 0.05$), 而 PPAR δ 、DHFR 的表达量是减少的, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 如图 2 和表 5



(A: WT + Ctr, B: WT + DM, C: Bmal1^{-/-} + Ctr, D: Bmal1^{-/-} + DM)

Figure 2. Expression of Bmal1 and PPAR δ pathway proteins in mesenteric artery endothelial cells in each group

图 2. 各组肠系膜动脉内皮细胞中 Bmal1 及 PPAR δ 通路蛋白的表达情况

Table 5. Comparison of expression levels of Bmal1, PPAR δ , DHFR and eNOS uncoupling in mesenteric artery endothelial cells in each group ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

表 5. 各组肠系膜动脉内皮细胞中 Bmal1、PPAR δ 、DHFR 表达水平及 eNOS 解偶联情况对比($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

分组	Bmal1	PPAR δ	DHFR	eNOS dimer/monomer
WT + Ctr	1.61 \pm 0.08	1.09 \pm 0.06	0.71 \pm 0.06	3.73 \pm 0.96
WT + DM	1.29 \pm 0.09	0.86 \pm 0.06	0.56 \pm 0.05	2.07 \pm 0.39
Bmal1 ^{-/-} + Ctr	0.08 \pm 0.01*	0.61 \pm 0.07*	0.39 \pm 0.03*	1.19 \pm 0.18*
Bmal1 ^{-/-} + DM	0.06 \pm 0.01#	0.47 \pm 0.05#&	0.24 \pm 0.04#&	0.79 \pm 0.11#&

注: 各指标组间比较, $F = 24.34 \sim 746.45$, $P < 0.01$ 。与 WT + Ctr 组相比, * $P < 0.01$; 与 WT + DM 组相比, # $P < 0.01$; 与 Bmal1^{-/-} + Ctr 组相比, & $P < 0.01$ 。

4. 讨论

微血管是体内大中血管的分支, 广泛分布于全身的组织器官, 是血液循环的重要结构基础, 糖尿病(DM)是微血管损伤最常见原因之一, 对肾脏、心脏、神经、视网膜等重要器官的结构和功能造成破坏, 对患者的生存质量带来很大影响。长期的高糖环境下, 微血管内可出现糖基化亢进、活性氧(ROS)和自由基增加、糖基化终产物(AGEs)堆积、蛋白激酶 C(PKC)途径激活等多重反应, 破坏微血管的结构, 影响微血管的收缩和舒张功能[12]。内皮细胞是覆盖在血管内壁的单层鳞状细胞, 受高血糖的影响也最为直接, 内皮功能障碍被认为是糖尿病微血管损伤的主要特征, 表现为内皮的一氧化氮(NO)合成减少, ROS 的生成增加, 血管内皮依赖性舒张功能(EDR)是内皮功能障碍的常用检测指标[3]。

生物钟是 24 小时的周期性行为及生理波动, 由下丘脑视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN)的中枢性主时钟控制, 在外周的组织中还存在着外周生物钟, 有一定自主性, 但也受中枢时钟的调控[13]。转录因子 Bmal1 是最为重要的时钟蛋白, 它通过和 Clock 蛋白构成异源二聚体, 结合在基因启动子上游的 E-box 位点, 调控下游时钟基因的表达, 推动生物钟的运转[14]。经过遗传学分析, Bmal1 与高血压和糖尿病的易感性有关, 在动物实验和临床实践中, 也发现了 Bmal1 和糖尿病、高血压、缺血性心肌病等慢性疾病存在联系[15]。

在本实验中, 我们发现 WT + DM 组的 EDR 是差于 WT + Ctr 组的($P < 0.05$), 但好于 Bmal1^{-/-} + DM 组($P < 0.05$), 这说明糖尿病造模引起了小鼠肠系膜动脉的 EDR 损伤, Bmal1 基因的缺失加重了糖尿病小鼠的肠系膜动脉 EDR 损伤。通过对 Bmal1 及 PPAR δ 通路蛋白的表达量进行检测, 我们发现在 Bmal1 敲除的小鼠肠系膜动脉内皮细胞中, Bmal1、PPAR δ 、DHFR 的表达都是减少的($P < 0.01$), eNOS 的解偶联是增加的, 这说明 Bmal1 的敲除可通过影响减少 PPAR δ 的表达, 进而减低下游 DHFR 的表达, 促进 eNOS 的解偶联, 影响内皮 NO 的合成来使 EDR 功能受损。另外, Bmal1^{-/-} + DM 组和 Bmal1^{-/-} + Ctr 组对比, Bmal1 的表达量趋近于零, 且差异无统计学意义($P > 0.05$), 而 PPAR δ 、DHFR 的表达量是减少的, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 这也说明 Bmal1 虽然可以调控 PPAR δ 的表达, 但并非不可或缺, 同时 DM 对 PPAR δ 的合成也有一定的调控作用。

5. 总结

综上所述, 糖尿病可引起微血管的 EDR 受损, Bmal1 的敲除可加重糖尿病微血管的 EDR 损伤, PPAR δ 介导了 Bmal1 对 EDR 的影响。本次研究是首次对生物钟家族蛋白和糖尿病微血管损伤之间的关系进行功能学探索, 并首次提出 Bmal1 可通过 PPAR δ 来影响 EDR, 为生物钟在血管领域的研究提供了新的方法和思路。但 Bmal1 基因的靶点众多, 可能涉及到多种机制的共同调节, 仍需要进一步的探讨[16]。

基金项目

青岛市科技惠民示范引导专项(21-1-4-rkjk-9-nsh); 青岛市医疗卫生优秀学科带头人计划(青卫科教字[2019]9号)。

参考文献

- [1] Sun, H., Saeedi, P., Karuranga, S., et al. (2022) IDF Diabetes Atlas: Global, Regional and Country-Level Diabetes Prevalence Estimates for 2021 and Projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **183**, Article ID: 109119. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109119>
- [2] Haque, S.N., Booreddy, S.R. and Welsh, D.K. (2019) Focus: Clocks and Cycles: Effects of BMAL1 Manipulation on the Brain's Master Circadian Clock and Behavior. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, **92**, 251-258.
- [3] Zhang, Z., Xie, X., Yao, Q., et al. (2019) PPAR δ Agonist Prevents Endothelial Dysfunction via Induction of Dihydro-

- folate Reductase Gene and Activation of Tetrahydrobiopterin Salvage Pathway. *British Journal of Pharmacology*, **176**, 2945-2961. <https://doi.org/10.1111/bph.14745>
- [4] Alexander, R.K., Liou, Y.H., Knudsen, N.H., *et al.* (2020) Bmal1 Integrates Mitochondrial Metabolism and Macrophage Activation. *eLife*, **9**, e54090. <https://doi.org/10.7554/eLife.54090>
- [5] Morris, C.J., Purvis, T.E., Hu, K., *et al.* (2016) Circadian Misalignment Increases Cardiovascular Disease Risk Factors in Humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113**, E1402-E1411. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516953113>
- [6] Culebras, A. (2004) Cerebrovascular Disease and Sleep. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, **4**, 164-169. <https://doi.org/10.1007/s11910-004-0032-6>
- [7] Reppert, S.M. and Weaver, D.R. (2002) Coordination of Circadian Timing in Mammals. *Nature*, **418**, 935-941. <https://doi.org/10.1038/nature00965>
- [8] Sorop, O., Van De Wouw, J., Chandler, S., *et al.* (2020) Experimental Animal Models of Coronary Microvascular Dysfunction. *Cardiovascular Research*, **116**, 756-770. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa002>
- [9] Xu, J., Wang, S., Zhang, M., *et al.* (2012) Tyrosine Nitration of PA700 Links Proteasome Activation to Endothelial Dysfunction in Mouse Models with Cardiovascular Risk Factors. *PLOS ONE*, **7**, e29649. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029649>
- [10] Nakatsuru, Y., Murase-Mishiba, Y., Bessho-Tachibana, M., *et al.* (2018) Taurine Improves Glucose Tolerance in STZ-Induced Insulin-Deficient Diabetic Mice. *Diabetology International*, **9**, 234-242. <https://doi.org/10.1007/s13340-018-0353-3>
- [11] Wang, J., Niu, N., Xu, S., *et al.* (2019) A Simple Protocol for Isolating Mouse Lung Endothelial Cells. *Scientific Reports*, **9**, Article No. 1458. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37130-4>
- [12] Elbatarek, M.H., Pachado, M.P., Cuadrado, A., *et al.* (2019) Reactive Oxygen Comes of Age: Mechanism-Based Therapy of Diabetic End-Organ Damage. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, **30**, 312-327. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.02.006>
- [13] Herzog, E.D., Hermansteyne, T., Smyllie, N.J., *et al.* (2017) Regulating the Suprachiasmatic Nucleus (SCN) Circadian Clockwork: Interplay between Cell-Autonomous and Circuit-Level Mechanisms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **9**, a027706. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027706>
- [14] Ripperger, J.A. and Schibler, U. (2006) Rhythmic CLOCK-BMAL1 Binding to Multiple E-Box Motifs Drives Circadian Dbp Transcription and Chromatin Transitions. *Nature Genetics*, **38**, 369-374. <https://doi.org/10.1038/ng1738>
- [15] Woon, P.Y., Kaisaki, P.J., Bragança, J., *et al.* (2007) Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-Like (BMAL1) Is Associated with Susceptibility to Hypertension and Type 2 Diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 14412-14417. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703247104>
- [16] Menet, J.S., Pescatore, S. and Rosbash, M. (2014) CLOCK: BMAL1 Is a Pioneer-Like Transcription Factor. *Genes & Development*, **28**, 8-13. <https://doi.org/10.1101/gad.228536.113>