

• 论 著 •

基于夜间睡眠干扰及夜间光暴露增加构建睡眠剥夺
对小鼠冠心病的影响

朱 军¹,王 屹¹,郭红梅¹,王 伟¹,王连生²

(1. 南京医科大学附属老年医院/江苏省老年病医院心血管内科,江苏 南京 210024;2. 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 使用睡眠干扰及增加夜间光(LAN)暴露的方法构建小鼠睡眠剥夺(SD)模型,并分析SD对冠心病(CAD)发病可能的机制。方法 选用2月龄雄性ICR小鼠12只,将其随机分为SD模型组、对照组,每组6只。构建成年ICR小鼠SD模型。通过公共数据库检索,筛选可能参与CAD的发病基因。通过实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)验证筛选后的基因mRNA水平差异,并进一步采用蛋白质印迹法(Western blot)验证相关分子的蛋白表达特点。结果 最终筛选出10个已被报道与CAD相关的基因。qRT-PCR结果表明,对照组和SD模型组小鼠心脏中前蛋白转化酶枯草溶菌素9(PCSK9)、丝裂原激活的蛋白激酶-活化蛋白激酶5(MAPKAPK5)、Tectonic1(TCTN1)、Kaptin(KPTN)和G蛋白信号调节因子19(RGS19)5个基因mRNA表达存在显著性差异($P<0.05$)。Western blot结果证实,PCSK9、MAPKAPK5、TCTN1、KPTN和RGS19蛋白表达变化规律与其mRNA变化一致。此外,SD模型组小鼠心肌组织中炎症因子[白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)]的蛋白水平显著升高($P<0.05$)。结论 小鼠SD模型中PCSK9、MAPKAPK5、TCTN1、KPTN和RGS19等CAD相关基因表达存在差异,可能参与SD相关的CAD发病机制。

[关键词] 冠心病; 睡眠剥夺; 光暴露; 差异表达基因; 炎症因子

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2025.10.013 中图法分类号:R541.4

文章编号:1009-5519(2025)10-2322-04 文献标识码:A

The effect of sleep deprivation on coronary heart disease in mice based on
nighttime sleep disturbance and increased nighttime light exposure

ZHU Jun¹,WANG Yi¹,GUO Hongmei¹,WANG Wei¹,WANG Liansheng²

(1. Department of Cardiology, Geriatric Hospital of Nanjing Medical University/Jiangsu Province Geriatric Hospital, Nanjing, Jiangsu 210024, China; 2. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China)

[Abstract] Objective To construct a mouse sleep deprivation(SD) model by using sleep disturbance and increasing light at night(LAN)exposure, and to analyze the possible mechanism of SD on the onset of coronary artery disease(CAD). Methods Twelve 2-month-old male ICR mice were selected, they were randomly divided into SD model group and control group, with 6 rats in each group. The SD model of adult ICR mice was constructed. Through public database retrieval, the genes that may be involved in CAD were screened. Real-time quantitative reverse transcription PCR(qRT-PCR) was used to verify the differences in mRNA levels of the screened genes, and Western blot was further used to verify the protein expression characteristics of the related molecules. Results Ten CAD-related genes were screened through published literature and public database searches. The qRT-PCR results showed that there were significant differences in mRNA expression of five genes, including proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), mitogen activated protein kinase 5 (MAPKAPK5), Tectonic1 (TCTN1), Kaptin (KPTN), and regulatory of G protein signaling 19 (RGS19), between the control group and the SD model group($P<0.05$). Further Western blot results confirmed that the expression patterns of PCSK9, MAPKAPK5, TCTN1, KPTN, and RGS19 proteins were consistent with their mRNA changes. In addition, the protein level of inflammatory factors (IL-6, TNF- α) were found significantly increased in the myocardial tissue of SD group mice ($P<0.05$). Conclusion There are differences in the expression of CAD-related genes such as PCSK9, MAPKAPK5, TCTN1, KPTN and RGS19 in mouse SD model, which may be involved in the pathogenesis of SD-related CAD.

[Key words] Coronary artery disease; Sleep deprivation; Light exposure; Differential expressed genes; Inflammatory cytokines

环境因素在冠心病(CAD)发病过程中的作用已经被证实^[1]。睡眠质量差(PSQ)、运动减少等环境因素易导致 CAD 正在被大家所熟知和接受^[2-3]。PSQ 往往通过影响糖代谢和血压导致胰岛素抵抗和代谢综合征,进而增加心血管疾病的风险^[4]。睡眠障碍与 CAD 也存在关联^[5]。此外,睡眠障碍还与急性心肌梗死(AMI)关系密切^[6]。伴 PSQ 患者外周循环中代谢激素水平出现显著改变^[7]。在睡眠剥夺(SD)期间,葡萄糖代谢也会减慢^[8]。急性 SD 则会促进炎症进展,加重心肌梗死后心脏泵衰竭^[9]。因此,推测 SD 可能是胰岛素抵抗发展和炎症介质升高的潜在重要促进机制。

综上所述,PSQ 可能参与了 CAD 的发病,然而其中具体的机制仍需要进一步明确。本研究将通过施加睡眠干扰及增加夜间光(LAN)暴露构建小鼠 SD 模型,通过比较 SD 模型组及对照组小鼠心脏的基因表达差异,发现 CAD 发病相关的基因,为 CAD 的防治提供可能的潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 动物 雄性 SPF 级 ICR-CD1 小鼠均购买并饲养于南京医科大学实验动物中心。所有小鼠实验均被南京医科大学动物伦理委员会批准(伦理编号为 IACUC:1601038-5)。涉及的动物麻醉、手术等操作都遵循下列相关条例:美国国立卫生研究院《the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals》和《江苏省实验动物管理办法(江苏省人民政府第 45 号)》。

1.2 方法

1.2.1 SD 模型的建立 选用 2 月龄雄性 ICR 小鼠 12 只,随机分为 SD 模型组、对照组,每组 6 只。模型构建方法:将小鼠鼠笼中加入 1 cm 深的水,确保小鼠无法正常进入睡眠,正常供应小鼠饲料和饮用水,每天更换鼠笼中的水。SD 模型组小鼠于夜间施加 4 h 的 SD 处理和 LAN 暴露(19:00—23:00),其余时段保持与对照组小鼠相同处理,维持正常睡眠,连续实施 2 周。对照组小鼠饲养于正常笼盒中,并进行自然状态下强弱光处理,保持 12 h 强光(7:00—19:00)、12 h 弱光(19:00 至次日 7:00)处理。

1.2.2 小鼠褪黑素(MT)检测 小鼠血清 MT 水平检测按照试剂盒说明(ml077242,上海酶联生物科技有限公司)进行。简单地说,小鼠眼球取血置于 1.5 mL 离心管中,加入试剂后,涡旋混匀,10 000 g 离心 10 min,弃去上层水相,加入 0.2 mL 甲醇。按照试剂盒说明配置标准品,最后将标准品和待测样品加入液相色谱柱,设置荧光检测激发波长 280 nm、发射波长

340 nm 进行检测。

1.2.3 心脏组织取材 取材前使用 1.2% 三溴乙醇(每 10 克体重 200 μ L)充分麻醉。待完全麻醉后处死小鼠,酒精消毒后使用剪刀开胸,用镊子取下心脏后立即于磷酸盐缓冲液内挤出心腔残余血液,完全挤出血液后使用显微手术剪刀和显微手术镊轻柔地将心脏的纤维组织剥离,保留完整心脏,用滤纸吸取组织表面液体后,放入液氮并置于一 80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存,用于后续检测。

1.2.4 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)验证 使用 Trizol 法提取组织 RNA,检测浓度后进行逆转录反应。逆转录完成后,使用 SYBR GREEN 法进行 qRT-PCR 分析,检测 2 组心肌组织各基因的 mRNA 表达水平,根据试剂盒推荐的反应体系配制混合液加入荧光定量 PCR384 孔反应板,在荧光定量 PCR 仪上设定相应的 PCR 反应程序进行荧光信号采集。

1.2.5 Western blot 检测 在每管心肌组织中加入 RIPA 蛋白裂解液 300 μ L,并加入 PMSF,然后将剪刀消毒擦净后将组织尽量剪碎,剪碎过程需保持在冰上操作。获得的蛋白提取液经超声仪(4 $^{\circ}$ C,能量 25%)超声 3 s 后立即放入冰中降温;而后再次超声,如此循环 3 次。将装有组织蛋白的 EP 管在冰上静置 1 h 裂解,期间每 10 分钟涡旋 1 次,每次 3 s;涡旋结束后将 EP 管放于高速离心机中离心(4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min)1 h。离心结束后,用移液枪小心收集上清液置于新的 1.5 mL EP 管中待用。将待测的蛋白样品液加入 5 $\times$ Buffer 蛋白上样缓冲液中,按照配置相关实验溶液,加样,电泳,转膜,封闭,一抗孵育,二抗孵育,发光显影等,使用化学发光成像仪对条带进行曝光及采集统计图像结果。

1.2.6 SD 模型组小鼠心脏炎症水平变化 使用 Western blot 检测 SD 模型组小鼠心脏炎症指标,如白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等的变化水平。

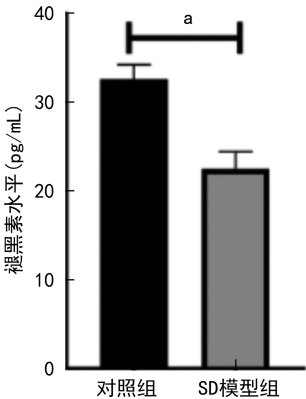
1.3 统计学处理 应用 SPSS25.0 进行分析。2 组间均值比较,当数据符合正态分布时进行非配对 t 检验,否则进行假设不等方差 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成年小鼠 SD 模型的建立 SD 模型组小鼠血清 MT 水平显著降低,见图 1,提示 SD 模型构建成功。

2.2 筛选 CAD 发病相关基因 本课题前期研究发现,智能手机成瘾会导致 PSQ,可能进一步影响 CAD 的发病^[10]。通过检索公共数据库已发表文献筛选

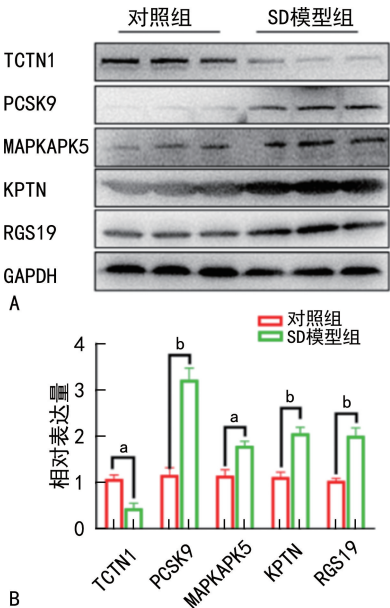
CAD 发病的相关基因^[10],最终筛选出 10 个已被报道与 CAD 相关的基因。



注:与对照组比较,^a $P<0.001$, $n=6$ 。

图1 SD模型组与对照组成年小鼠血清 MT 水平比较

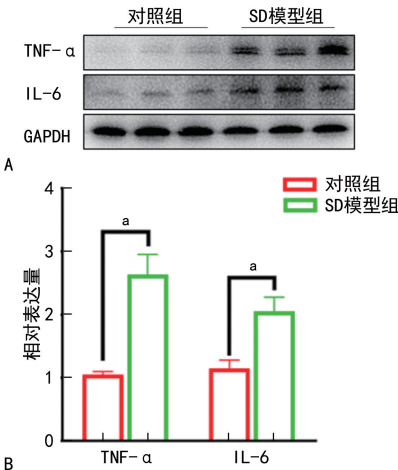
2.3 CAD 发病相关基因的表达验证 对上述 10 个基因进行 mRNA 差异表达验证,结果显示前蛋白转化酶枯草溶菌素 9(PCSK9)、丝裂原激活的蛋白激酶-活化蛋白激酶 5(MAPKAPK5)、Kaptin(KPTN)和 G 蛋白信号调节因子 19(RGS19)这 4 个基因的 mRNA 水平在 SD 模型组显著升高($P<0.05$),而 Tectonic1(TCTN1)显著降低($P<0.05$)。Western blot 检测表明 SD 模型组 PCSK9、MAPKAPK5、KPTN 和 RGS19 的蛋白表达水平明显高于对照组($P<0.05$),而 TCTN1 相反,上述 5 个基因的蛋白表达规律与 mRNA 一致。见图 2。



注:A. CAD 发病基因的蛋白水平检测;B. CAD 发病基因的定量分析。^a $P<0.01$,^b $P<0.001$ 。

图2 SD模型组和对照组成小鼠 CAD 发病基因表达水平检测

2.4 SD 模型组小鼠心脏炎症水平 SD 模型组小鼠心肌组织中炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 3A、B。



注:A. 蛋白表达水平检测;B. 定量分析。^a $P<0.01$ 。

图3 SD模型组和对照组小鼠 IL-6 和 TNF- α 水平检测

3 讨论

本研究在小鼠 SD 模型中通过 qRT-PCR 和 Western blot 方法验证了 CAD 相关基因表达差异,同时检测 CAD 相关炎症因子(IL-6、TNF- α)是否有差异。结果发现,小鼠 SD 模型中 CAD 相关基因(PCSK9、MAPKAPK5、TCTN1、KPTN 和 RGS19)的表达存在差异,其中 PCSK9、MAPKAPK5、KPTN 和 RGS19 表达上调,而 TCTN1 基因表达下调。同时检测到小鼠 SD 中与 CAD 发病相关的炎症因子(IL-6、TNF- α)等指标表达上调,因此 PCSK9、MAPKAPK5、KPTN 和 RGS19 这 4 个基因可能是 SD 导致 CAD 发病风险增加的潜在分子,其中涉及机制可能包括睡眠干扰和 LAN 暴露增加。

有研究表明,与睡眠质量好的参与者相比,睡眠质量受损和 PSQ 的参与者高脂血症的危险性升高^[11]。PSQ 与增加 CAD 发病的总胆固醇及低密度脂蛋白水平均关系密切^[12]。PSQ 已经被明确证实与 CAD 关系密切,属于 CAD 的易患因素^[13]。本研究通过夜间睡眠干扰及增加夜间强光暴露的方法构建了小鼠 SD 模型,通过检测小鼠体内 MT 水平验证 SD 模型构建成功,在成功构建小鼠 SD 模型后,进一步观察到包括 PCSK9 在内的一系列 CAD 发病基因在 SD 模型组存在显著差异表达。PCSK9 是由 PCSK9 基因编码的丝氨酸蛋白酶,主要由肝脏产生,PCSK9 与 CAD 发病等关系密切,抑制 PCSK9 可降低循环 LDL 水平并降低 CAD 发病风险^[14]。此外,还有研究证实,使用 PCSK9 抑制剂后可以减轻氧化应激和炎症,增强巨噬细胞自噬,促进动脉粥样硬化改善^[15]。本研究还显示,MAPKAPK5 在 SD 模型组中的表达显著上调。MAPKAPK5 作为丝裂原活化蛋白激酶具有显著序列同源性的新型蛋白激酶,在体外可以被细胞外调节激酶和 p38 激酶磷酸化^[16]。MAPKAPK5 参与调节包括细胞增殖、分化和运动等细胞过程^[17]。既往研究显示,MAPKAPK5 与 CAD 的发生风险相关^[18]。

此外,本研究还观察到在 小鼠 SD 模型中,TCTN1 及 KPTN 的 mRNA 及蛋白水平表达有差异,这提示 TCTN1 和 KPTN 可能是参与调节 SD 后 CAD 发病的潜在基因。本研究观察到 SD 后 TCTN1 基因的表达出现了下调,与 ERBILGIN 等^[19]观察的结果一致。KPTN 是由 Kaptin 基因编码的一种参与肌动蛋白细胞骨架动力学的蛋白质。KPTN 基因突变与 CAD 风险增加相关^[10]。本研究观察到 RGS19 的 mRNA 水平及蛋白水平在 SD 后均有明显上调。RGS19 是一种多功能蛋白,可调节多种癌症的进展,RGS19 在肝细胞癌组织中的表达上调,并且与肝细胞癌患者的不良预后显著相关,RGS19 在体外和体内均促进肝细胞癌细胞的增殖和转移^[20]。综上所述,PCSK9、MAPKAPK5、TCTN1、KPTN 和 RGS19 等基因的表达在 SD 模型组中表达有显著差异,说明上述基因可能参与 CAD 的发病。

本研究结果还发现,小鼠 SD 后炎症因子(IL-6、TNF-α)等均有明显升高,而 IL-6、TNF-α 等炎症因子均与 CAD 关系密切,因此 SD 可能会上调 IL-6、TNF-α 等炎症因子参与 CAD 发病。建议添加一段总结性的文字

参考文献

[1] YANG F,XU F,ZHANG H,et al. Proteomic insights into the associations between obesity,lifestyle factors, and coronary artery disease[J]. BMC Med,2023,21(1):485.

[2] KWOK C S,KONTOPANTELIS E,KULIGOWSKI G, et al. Self-reported sleep duration and quality and cardiovascular disease and mortality;a dose-response meta-analysis[J]. J Am Heart Assoc,2018,7(15):e008552.

[3] BAHLS M,LEITZMANN M F,KARCH A,et al. Physical activity,sedentary behavior and risk of coronary artery disease,myocardial infarction and ischemic stroke;a two-sample Mendelian randomization study[J]. Clin Res Cardiol,2021,110:1564-1573.

[4] MILLER M A,HOWARTH N E. Sleep and cardiovascular disease[J]. Emerg Top Life Sci,2023,7(5):457-466.

[5] DEY S,SUN E,FRISHMAN W H,et al. Sleep disorders and coronary artery disease[J]. Cardiol Rev,2023,31(4):219-224.

[6] ARORA N,RICHMOND R C,BRUMPTON B M,et al. Self-reported insomnia symptoms,sleep duration,chronotype and the risk of acute myocardial infarction (AMI):a prospective study in the UK Biobank and the HUNT Study[J]. Eur J Epidemiol,2023,38(6):643-656.

[7] ZISAPEL N. New perspectives on the role of melatonin in human sleep,circadian rhythms and their regulation[J]. Br J Pharmacol,2018,175(16):3190-3199.

[8] DA SILVA B R D,NUNES P I G,SANTOS F A,et al.

Exercise modifies lipid and glucose metabolism alterations induced by sleep deprivation in mice[J]. Sleep Sci,2022,15(3):347-350.

[9] ZHU Y,CHEN X,GUO L,et al. Acute sleep deprivation increases inflammation and aggravates heart failure after myocardial infarction[J]. J Sleep Res,2022,31(6):E13679.

[10] LI L,CHEN Z,SCHEIDT M,et al. Transcriptome-wide association study of coronary artery disease identifies novel susceptibility genes[J]. Basic Res Cardiol,2022,117(1):6.

[11] BARIKANI A,JAVADI M,RAFIEI S. Sleep quality and blood lipid composition among patients with diabetes[J]. Int J Endocrinol Metab,2019,17(3):e81062.

[12] BOS M M,NOORDAM R,VAN DEN BERG R,et al. Associations of sleep duration and quality with serum and hepatic lipids: the netherlands epidemiology of obesity study[J]. J Sleep Res,2019,28(4):e12776.

[13] CHO S M J,KOYAMA S,HONIGBERG M C,et al. Genetic,sociodemographic,lifestyle, and clinical risk factors of recurrent coronary artery disease events:a population-based cohort study[J]. Eur Heart J,2023,44(36):3456-3465.

[14] PETERSEN-URIBE A,KREMSER M,ROHLFING A K,et al. Platelet-derived PCSK9 Is associated with LDL metabolism and modulates atherothrombotic mechanisms in coronary artery disease[J]. Int J Mol Sci,2021,22(20):11179.

[15] YANG J,MA X,NIU D,et al. PCSK9 inhibitors suppress oxidative stress and inflammation in atherosclerotic development by promoting macrophage autophagy[J]. Am J Translation Res,2023,15(8):5129-5144.

[16] SAHADEVAN P,ALLEN B G. MK5;a novel regulator of cardiac fibroblast function? [J]. IUBMB Life,2017,69(10):785-794.

[17] ZHOU Y,LIU S,LUO Y,et al. lncRNA MAPKAPK5-AS1 promotes proliferation and migration of thyroid cancer cell lines by targeting miR-519e-5p/YWHAH[J]. Eur J Histochem,2020,64(4):3177.

[18] ERBILGIN A,CIVELEK M,ROMANOSKI C E,et al. Identification of CAD candidate genes in GWAS loci and their expression in vascular cells[J]. J Lipid Res,2013,54(7):1894-1905.

[19] LEVITIN M O,RAWLINS L E,SANCHEZ-ANDRADE G, et al. Models of KPTN-related disorder implicate mTOR signalling in cognitive and overgrowth phenotypes [J]. Brain,2023,146(11):4766-4783.

[20] KE S,LU S,XU Y,et al. RGS19 activates the MYH9/β-catenin/c-Myc positive feedback loop in hepatocellular carcinoma[J]. Exp Mol Med,2024,56(6):1412-1425.