

本文引用: 李汶霖, 李赛男, 杨尧, 等. 昼夜节律和时钟基因在动脉粥样硬化发生中的作用机制研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2025, 33(5): 369-377. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2025.05.001.

[文章编号] 1007-3949(2025)33-05-0369-09

· 专家论坛 ·

## 昼夜节律和时钟基因在动脉粥样硬化发生中的作用机制研究进展

李汶霖, 李赛男, 杨尧, 马启楠, 黄秀清, 窦琳, 刘德平, 黎健, 沈涛

北京医院 国家老年医学中心 国家卫生健康委北京老年医学研究所 国家卫生健康委老年医学重点实验室  
中国医学科学院老年医学研究院, 北京市 100730

[专家简介] 沈涛, 研究员, 北京医院国家老年医学中心研究员, 生化研究室 PI。北京大学医学部、北京协和医学院、国家卫生健康委北京老年医学研究所博士生导师。主要从事心力衰竭、心肌肥厚、动脉粥样硬化发病机制和心血管药物治疗机制的相关研究。主持国家自然科学基金项目 4 项, 北京市自然科学基金项目 1 项, 高水平医院人才支撑专项基金项目 2 项, 美国心脏学会 AHA 基金项目 1 项等。参加国家重点研发基金、北京市自然科学基金重点研究专题项目等。相关研究成果发表在 *STTT*、*JCI* 等杂志 90 余篇。担任国际动脉粥样硬化学会中国分会理事、中国病理生理学会第九届动脉粥样硬化专业委员会副主任委员、中国老年学和老年医学学会老年病学分会常务委员、中国老年医学学会基础与转化医学分会委员等。此外, 还担任《中国动脉硬化杂志》《中国心血管杂志》和 *Aging Medicine* 编委。



[摘要] 随着全球人口寿命的延长和老龄化问题的日益严峻, 心血管疾病已经成为老龄化人群的主要死亡原因。心血管疾病大多起源于动脉粥样硬化斑块的形成。除了常见的危险因素, 如血脂异常、糖尿病、高血压、吸烟和肥胖外, 昼夜节律的紊乱也被视为动脉粥样硬化的一个重要但常被忽视的危险因素。昼夜节律参与调节炎症和代谢等关键生理过程, 进而影响动脉硬化和血栓形成的病理过程。在这一过程中, 维持昼夜节律稳定的关键基因, 即时钟基因, 扮演着至关重要的角色。时钟基因在动脉粥样硬化的病理机制中具有重要作用, 它们有可能成为预防和治疗动脉粥样硬化的潜在新靶点。本文综述了时钟基因在动脉粥样硬化发生和发展中的作用机制的最新研究进展, 这些发现可能为动脉粥样硬化的诊断和治疗提供新的思路。

[关键词] 动脉粥样硬化; 时钟基因; 昼夜节律; 糖脂代谢; 巨噬细胞

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### The progress of the role and mechanisms of circadian rhythm and clock gene in the development of atherosclerosis

LI Wenlin, LI Sainan, YANG Yao, MA Qinan, HUANG Xiuqing, DOU Lin, LIU Deping, LI Jian, SHEN Tao  
Beijing Hospital & National Geriatrics Center & Beijing Institute of Geriatrics of the National Health Commission & Beijing Key Laboratory of Geriatrics of the National Health Commission & Institute of Geriatrics of the Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

[ABSTRACT] With the extension of the global population's lifespan and the increasingly severe aging problem, cardiovascular diseases have become the leading cause of death among the elderly population. Most cardiovascular diseases originate from the formation of atherosclerotic plaques. In addition to common risk factors such as dyslipidemia, diabetes, hypertension, smoking, and obesity, circadian rhythm disruption is also regarded as an important but often overlooked risk factor for atherosclerosis. The circadian rhythm is involved in regulating key physiological processes such as inflammation and metabolism, which in turn affect the pathological processes of arteriosclerosis and thrombosis. In this process, the

[收稿日期] 2024-05-13

[修回日期] 2024-07-09

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81770228, 82370584); 北京市自然科学基金项目(7232141)

[作者简介] 李汶霖, 硕士研究生, 研究方向为心血管疾病发病机制, E-mail: 1044735985@qq.com。通信作者沈涛, 博士后, 研究员, 研究方向为心血管疾病发病机制, E-mail: shentao4189@bjhmoh.cn。

key genes that maintain the stability of the circadian rhythm, namely clock gene, play a crucial role. Clock gene have an important role in the pathological mechanism of atherosclerosis, and they may become potential new targets for the prevention and treatment of atherosclerosis. This paper reviews the latest research progress on the mechanism of action of clock gene in the occurrence and development of atherosclerosis. These findings may provide new ideas for the diagnosis and treatment of atherosclerosis.

[KEY WORDS] atherosclerosis; clock gene; circadian rhythm; lipid metabolism; macrophage

近年来,随着社会人口老龄化趋势的加剧,心血管疾病已经成为一个日趋严重的公共卫生挑战。尽管全球在预防和治疗心血管疾病方面已经取得了巨大的进展,但心血管疾病的死亡率仍然居高不下<sup>[1]</sup>。冠心病、高血压和中风已经成为全球三大主要的致死病因。心血管疾病的总发病率在过去30年里翻了一番,从1990年的2.71亿例增长到2022年的5.23亿例,心血管疾病的死亡人数也从1990年的1210万例增加到2019年的1860万例,其中974万例死于缺血性心脏病,655万例死于卒中,而动脉粥样硬化是这些疾病的主要病理基础<sup>[2]</sup>。动脉粥样硬化是一种中动脉或大动脉血管壁因慢性炎症刺激而形成的脂质粥样斑块沉积,导致血管狭窄或血流量减少的血管疾病。动脉粥样硬化起始于血管内膜受损,随后中性粒细胞、单核-巨噬细胞、树突状细胞、T细胞和B细胞等炎症细胞受到募集。这些炎症细胞加剧了内皮细胞的损伤,并进一步导致低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)的内吞、炎症细胞的聚集以及LDL的氧化<sup>[3-4]</sup>。被招募的巨噬细胞和平滑肌细胞吞噬氧化的LDL,形成泡沫细胞,这些细胞最终发生凋亡坏死,释放其内容和脂质,从而促进了坏死核心的形成。此外,巨噬细胞产生的细胞因子和干扰素 $\gamma$ 能够激活T细胞,并诱导平滑肌细胞向内皮下区域增殖和迁移,形成纤维帽以稳定坏死核心<sup>[4]</sup>。同时,巨噬细胞还会分泌基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP),这些酶能够分解斑块中的基质,导致纤维帽变薄并破坏斑块的稳定性,从而引起斑块破裂和出血,形成继发性血栓,引发急性冠脉综合征<sup>[5]</sup>。此外,内膜钙化和新生血管形成等病理过程也会加速斑块破裂、血栓形成和急性心血管事件的发生。由于动脉粥样硬化是一个缓慢进展的过程,大多数病例在数十年间可能没有任何症状,只有当血管腔显著狭窄或血栓性阻塞导致组织器官供血严重下降时,才出现临床症状。动脉粥样硬化患者根据受累的供血区域不同,临床表现各异,在心脏和大脑等关键器官中,血流受限的狭窄病变可引起急性症状,如心绞痛、心肌梗死或中风等,而在肾动脉中的

狭窄则通常表现为慢性、长期的综合征<sup>[3]</sup>。

动脉粥样硬化是一种与生理性老化和病理性过程相关的病理过程,多种环境和遗传因素被认为是其危险因素,包括糖尿病、家族性高胆固醇血症、高血压、吸烟和肥胖等<sup>[6]</sup>。近年来,昼夜节律的紊乱被视为促进动脉粥样硬化斑块形成的一个新的独立危险因素。在研究人类动脉粥样硬化发病机制的过程中,发现血浆脂质代谢水平、免疫细胞和促炎性细胞因子的水平都显示出昼夜节律的波动。一项研究指出,从事轮班工作导致昼夜节律紊乱的男性,其颈动脉内膜中膜平均厚度、最大厚度以及颈动脉斑块形成的风险是普通人的两倍以上。即便在调整了年龄等其他危险因素后,由昼夜节律紊乱导致的额外风险依然存在。然而,在女性群体中,并未观察到轮班工作与颈动脉粥样硬化之间存在显著的关联,这可能与雌激素对心血管系统的潜在保护作用有关<sup>[7]</sup>。Peñalvo等<sup>[7]</sup>将研究焦点放在中年男性身上,研究结果显示,从事夜班或轮班工作的男性在心脏代谢风险指标上普遍表现不佳,与白班工人相比,轮班工人出现亚临床动脉粥样硬化的可能性更高。关于昼夜节律对身体的影响, Morris等<sup>[8]</sup>研究发现,昼夜节律紊乱可导致血压、白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)、C反应蛋白、抵抗素和肿瘤坏死因子 $\alpha$ 水平上升,以及清醒状态下的心脏迷走神经调节能力下降和24小时尿肾上腺素排泄率降低。在另一项荟萃分析中,睡眠相位失调被发现会导致高密度脂蛋白降低、甘油三酯(triglyceride, TG)升高、胰岛素抵抗和肥胖,这些因素均可能促进动脉粥样硬化的形成<sup>[9]</sup>。因此,生物钟的紊乱导致脂质代谢和免疫系统的昼夜节律破坏,可能引发血脂异常和炎症,从而增加动脉粥样硬化的风险。这也表明昼夜节律可能是心血管疾病,尤其是动脉粥样硬化的一个重要危险因素。在本文中,我们将系统性综述时钟基因与动脉粥样硬化发生发展之间的紧密联系。

## 1 时钟基因的组成

最初,研究揭示了生物体的生理过程展现出与

日出日落同步的 24 小时周期性模式,这主要是光通过视网膜-下丘脑束刺激位于下丘的视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN)所导致的。SCN 通过下丘脑-垂体-肾上腺轴的神经-体液调节,同步化了外周组织中的时钟基因。此外,交感神经系统还可直接作用于外周组织,并通过调节神经突触释放去甲肾上腺素的节律性,直接控制局部组织的昼夜节律活动<sup>[10]</sup>。生物钟的神经中枢由多个时钟基因组成,这些基因通过调控转录-翻译反馈环路(transcription-translation feedback loops, TTFL)发挥调节机体昼夜节律生物钟的功能,时钟基因主要包括:脑和肌肉芳香烃受体核转运样蛋白 1(brain and muscle ARNT-like protein 1, BMAL1)、生物钟循环输出蛋白(circadian locomotor output cycles kaput, CLOCK)、隐花色素(cryptochrome, Cry)、周期蛋白(period, Per)、核受体亚家族 1 组 D 成员(nuclear receptor subfamily 1 group D member, NR1D/REV-ERB)和视黄酸相关孤儿受体(retinoic acid-related orphan receptor, ROR)<sup>[11]</sup>。

在分子层面,哺乳动物的昼夜节律变化是由一个复杂的转录因子网络和相互作用的 TTFL 构成的,这些机制共同作用产生周期约为 24 小时的生物节律。当受到光照时,SCN 被激活,并将光信号转化为激素信号和神经冲动,进而调节外周组织中的时钟基因表达。BMAL1 作为生物钟的关键调节因子,在调控昼夜节律以及维持细胞和器官的正常生理功能方面发挥着核心作用。当 SCN 受到刺激,转录激活因子 BMAL1 与 CLOCK 形成异二聚体复合

物,并结合到启动子区域的 E-box 调控位点(5'-CACGTG-3'),从而激活 Per1/2/3、Cry1/2、ROR $\alpha/\beta/\gamma$ 、REV-ERB  $\alpha/\beta$  等基因的转录。当 Per 和 Cry 在细胞质中积累并达到特定阈值时,它们形成的二聚体复合物被酪蛋白激酶 1 $\delta/\epsilon$ (casein kinase 1 $\delta/\epsilon$ , CK1 $\delta/\epsilon$ )磷酸化,并随后转运到细胞核内,在细胞核中抑制 BMAL1-CLOCK 异二聚体复合物介导的转录活动,形成一个负反馈回路。同时,转录激活因子 ROR $\alpha/\beta/\gamma$  和转录抑制因子 REV-ERB  $\alpha/\beta$  也能进入细胞核,在 BMAL1 和 CLOCK 的启动子区域与 ROR 响应元件(ROR response element, RRE)相互作用,REV-ERB  $\alpha/\beta$  通过负反馈机制调控 BMAL1 和 CLOCK 的基因表达,而 ROR $\alpha/\beta/\gamma$  则通过正反馈机制调控 BMAL1 和 CLOCK 的基因表达<sup>[11]</sup>(图 1)。目前研究已经揭示,在动脉粥样硬化患者或小鼠模型中,时钟基因的表达普遍下降或昼夜节律出现失调<sup>[12]</sup>。因此,动脉粥样硬化与时钟基因之间的关联也引起了学术界的广泛关注。

此外,一些不属于时钟基因的核受体也可调控时钟基因的表达或活性。生物钟通过激活不同的昼夜节律启动子元件,调节时钟控制基因(clock-controlled gene, CCG)的节律性表达,这些调控启动子元件包括 D-box、E-box 和 RRE。CCG 编码的蛋白质参与细胞代谢和炎症反应等多种重要过程<sup>[13]</sup>。尽管在大多数细胞中发现了相同的时钟机制,但 CCG 的昼夜节律表达模式却显示出高度的组织和细胞特异性。

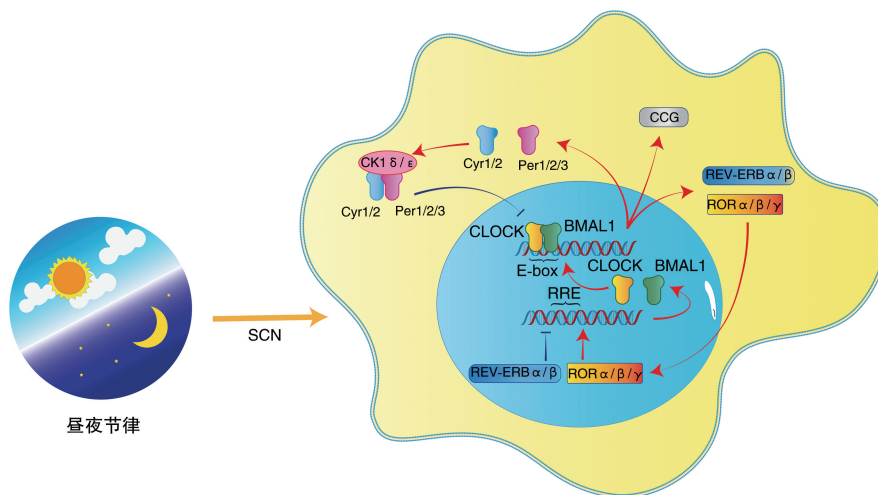


图 1. 时钟基因机制

当 SCN 受到外周环境节律性变化时,SCN 将光信号转化为激素信号和神经冲动,调节时钟基因节律性表达。在细胞中,昼夜节律的改变使 BMAL1 和 CLOCK 形成异二聚体复合物,并结合启动子区域中 E-box 序列,从而激活 Per 家族、Cry 家族、ROR 家族、REV-ERB 家族以及 CCG 的转录。Per1/2/3 和 Cry1/2 结合成二聚体复合物,转运到细胞核中并干扰 CLOCK-BMAL1 二聚体复合物介导的转录功能。REV-ERB 家族通过负反馈机制调控 BMAL1 和 CLOCK 的表达,ROR 则通过启动子区域的 RRE 正反馈机制调节 BMAL1 和 CLOCK 的表达。CCG 编码的蛋白质参与细胞代谢和炎症反应等多种重要过程,且具有高度的组织和细胞特异性。

Figure 1. Clock gene mechanism

## 2 时钟基因与动脉粥样硬化

### 2.1 时钟基因与脂质代谢紊乱

脂质代谢紊乱被认为是动脉粥样硬化形成的首要病因,其中胆固醇代谢异常在动脉粥样硬化的发病机制中尤为关键<sup>[14]</sup>。时钟基因通过影响胆固醇代谢参与动脉粥样硬化的发生发展。Chalfant等<sup>[15]</sup>将 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠置于持续的恒定光照下 12 周,破坏它们的昼夜节律稳定,结果发现雄性 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的动脉粥样硬化情况加剧,血液胆固醇浓度显著升高。CLOCK 参与调控肠道细胞和巨噬细胞的胆固醇代谢,有助于预防高胆固醇血症和动脉粥样硬化。与野生型小鼠相比,CLOCK 敲除的小鼠寿命缩短约 15%,并表现出衰老加速、肥胖和高血压的特征,同时葡萄糖和 TG 的昼夜节律也发生紊乱<sup>[16]</sup>。从 CLOCK 突变型小鼠中分离出的巨噬细胞表现出更高的总胆固醇(total cholesterol, TC)、游离胆固醇和酯化胆固醇水平,同时这些细胞对氧化脂蛋白的摄取量也有所增加。此外,在胆固醇逆向转运过程中,这些巨噬细胞的 ATP 结合盒转运蛋白 A1(ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1)和 ATP 结合盒转运蛋白 G1(ATP-binding cassette transporter G1, ABCG1)表达降低,导致其向载脂蛋白 A I 提供胆固醇的能力减弱。CLOCK 突变型小鼠的肠道中尼曼-匹克 C1 型类似蛋白 1(Niemann-Pick C1 like 1, NPC1L1)、胆固醇酰基转移酶 2(cholesterol acyltransferase 2, ACAT2)和微粒体甘油三酯转移蛋白(microsomal triglyceride transfer protein, MTP)表达升高,肠细胞聚集并分泌更多的乳糜微粒,肠道对胆固醇的吸收增强<sup>[17]</sup>。因此,CLOCK 不仅调控血液中巨噬细胞参与的脂质代谢过程,还能直接影响肠道对脂质的吸收。CLOCK 的缺失或突变会导致脂质代谢节律的调控发生紊乱,引发高脂血症,进而促进动脉粥样硬化的形成。

REV-ERB  $\alpha$  与脂质代谢过程密切相关。在 REV-ERB  $\alpha$  敲除的高脂饮食小鼠模型中,这些小鼠表现出体质量增加和轻度高血糖症状,且在高脂饮食条件下,脂质代谢紊乱的表现更为显著。REV-ERB  $\alpha$  的缺失导致夜间 CLOCK 表达上调,进而反馈性激活脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL), LPL 的激活促进了肌肉脂肪酸的产生,导致脂肪积累<sup>[18]</sup>。肝脏特异性敲除 REV-ERB  $\alpha$  的小鼠同样显示出血清胆固醇、TG、游离脂肪酸水平升高的脂质代谢异常<sup>[19]</sup>。因此,REV-ERB  $\alpha$  在脂质代谢的调控中扮演着重要角色,其表达异常与脂质代谢紊乱之间存在密切的关联。

此外,最近的研究显示,除了 CLOCK 和 REV-ERB  $\alpha$  之外,Cry 家族、Per 家族和 ROR 家族的成员也参与了脂质代谢的调节。研究指出,在 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠模型中,通过腺病毒介导的 Cry1 过表达,显著降低了血浆 TC、TG 和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)水平<sup>[20]</sup>。Cry1 可能在缓解脂质代谢紊乱方面具有关键作用,但其确切的功能和作用机制尚需进一步研究。Per2 缺失的小鼠会表现出早衰和脂质代谢紊乱的特征。Per2 通过调控前脂肪细胞中过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ ) 的活性,成为脂质代谢的主要调节因子<sup>[21]</sup>。SR1001 是一种特异性 ROR $\alpha/\beta/\gamma$  激动剂,在对高胆固醇饮食诱导的动脉粥样硬化小鼠模型进行 SR1001 处理后发现,ROR $\alpha/\beta/\gamma$  的激活显著减少了体内斑块的形成,其主要作用机制是促进肠道胆固醇的排泄,从而降低 LDLC 水平,同时不影响高密度脂蛋白的水平<sup>[22]</sup>。

在动脉粥样硬化的发生过程中,代谢重编程涉及的不仅仅是脂质代谢的紊乱,还包括糖代谢的紊乱。葡萄糖的摄取和浓度表现出明显的 24 小时节律性变化。然而,当 SCN 发生病变时,这种节律性变化会受到干扰,导致葡萄糖的摄取和浓度以及胰岛素水平的节律性紊乱。研究显示,CLOCK 或者 BMAL1 发生突变的小鼠会表现出葡萄糖耐受降低和胰岛素分泌减少的特征<sup>[16,23]</sup>。此外,抑制 Per2 的表达可导致血浆葡萄糖水平下降、胰岛素分泌增加以及糖异生受损<sup>[24]</sup>。REV-ERB  $\alpha$  的激活有助于降低血液和细胞内的葡萄糖水平。在小鼠肝细胞和人肝癌细胞中,REV-ERB  $\alpha$  通过调节葡萄糖-6-磷酸酶的活性来调控葡萄糖代谢。在葡萄糖代谢过程中,REV-ERB  $\alpha$  通过抑制糖代谢限速酶己糖激酶 II(hexokinase II, HK II)和 6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶 3(6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3, PFKFB3)的表达,从而减缓细胞增殖。此外,REV-ERB  $\alpha$  拮抗剂 SR8278 也被证实能够降低糖酵解水平,并提高细胞内乳酸水平。尽管在动脉粥样硬化的发生过程中,糖代谢的紊乱与时钟基因之间的联系已被揭示,但其具体分子机制尚不明确,这有待于进一步的研究。

### 2.2 时钟基因与炎症细胞活化

动脉粥样硬化是一种主要影响大中动脉的慢性炎症性病变,其中,炎症细胞的活化作为动脉粥样硬化炎症反应的重要病理过程,参与并推动了动脉粥样硬化的形成和发展。在动脉粥样硬化的初期阶段,血管内皮细胞受损,导致 LDLC 渗透至内膜

层,并在内膜被氧化修饰形成氧化 LDLC。氧化 LDLC 能够激活内皮细胞,促使趋化因子和黏附分子的表达,从而募集血液中的单核细胞,这些单核细胞在富含生长因子和促炎性细胞因子的微环境中分化为巨噬细胞。巨噬细胞通过其表面的清道夫受体迅速识别并吞噬氧化 LDLC,最终转化为泡沫细胞,这是动脉粥样硬化病变形成的早期标志<sup>[25]</sup>。在病变早期,巨噬细胞发生 M2 型极化,M2 型巨噬细胞通过分泌胶原蛋白和提高凋亡细胞的清除率来促进斑块的稳定。随着病变的进展,M2 型巨噬细胞的数量开始减少,M1 型巨噬细胞的数量逐渐增加,促炎因子分泌增加,这使得斑块更易破裂。同时,ABCA1 的表达减少,胆固醇外排受阻,导致血液中胆固醇水平进一步升高。这种胆固醇的积累进一步促进巨噬细胞活化和 M1 型极化,形成一个恶性循环<sup>[26]</sup>。此外,M1 型巨噬细胞可分泌 MMP,这导致斑块内细胞外基质的降解,最终导致斑块破裂,增加了急性心血管事件的发生风险。

BMAL1 是包含基本螺旋-环-螺旋结构域的转录因子家族之一。研究发现,BMAL1 敲除的小鼠会表现出寿命缩短和早衰的特征,伴随肌肉减少症、内脏和皮下脂肪组织减少、骨质疏松症、器官萎缩、血细胞组成改变以及压力降压反应丧失等病理现象<sup>[27]</sup>。在人颈动脉中,BMAL1 的减少会通过骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)介导的信号通路促进细胞内活性氧的积累和内皮间充质转化,这证实了 BMAL1 缺失在动脉粥样硬化发展中的关键作用<sup>[28]</sup>。在髓系细胞中,BMAL1 的缺失通过增强单核细胞的招募能力,进而促进动脉粥样硬化的形成。研究显示,当单核细胞和巨噬细胞特异性敲除 BMAL1 时,小鼠的颈动脉粥样硬化会加剧,这表明 BMAL1 在维持巨噬细胞功能方面具有重要作用<sup>[29]</sup>。此外,研究还发现,巨噬细胞中 BMAL1 的缺失可能导致 Ly6chi 单核细胞向动脉粥样硬化病变区域的迁移增多,从而增加了颈动脉中巨噬细胞的含量和病变区域的大小,进一步推动了动脉粥样硬化的进程<sup>[29]</sup>。因此,BMAL1 在维持正常的巨噬细胞功能方面具有不可或缺的作用。

REV-ERB 家族中的 REV-ERB  $\alpha$  在巨噬细胞的活化和浸润过程中发挥重要作用。研究发现,REV-ERB  $\alpha$  通过抑制 C-C 基序趋化因子配体 2(C-C motif chemokine ligand 2, CCL2)的表达,降低促炎性巨噬细胞的浸润。利用 shRNA 慢病毒转染技术特异性敲低小鼠骨髓造血细胞中的 REV-ERB  $\alpha$ ,结果显示,小鼠巨噬细胞在体内和体外的炎症表型增强,且主动脉粥样硬化病变加剧<sup>[30]</sup>。相反,通过使

用激动剂激活 REV-ERB  $\alpha$ ,可减少动脉粥样硬化斑块的形成,并减少骨髓源性小鼠巨噬细胞向 M1 型的极化,同时促进其向 M2 型的极化<sup>[31]</sup>。这些发现表明,针对 REV-ERB  $\alpha$  的靶向治疗可能通过调节巨噬细胞的功能,发挥治疗动脉粥样硬化的潜在临床作用。

SR1001 作为一种特异性的 ROR $\alpha/\beta/\gamma$  激动剂,通过激活 ROR $\alpha$  来减少辅助性 T 细胞 17(helper T cell 17, Th17),并增加调节性 T 细胞(Regulatory T cell, Treg)和 Th2,从而促进抗动脉粥样硬化免疫反应的增强<sup>[22]</sup>。这提示 ROR 家族可能也参与动脉粥样硬化中白细胞的活化过程,但其详细的分子机制和生理功能仍需进一步深入研究。

### 2.3 时钟基因与炎症因子分泌增加

在动脉粥样硬化的发展过程中,内皮细胞的损伤会促使多种炎症细胞向病变区域迁移,而这些炎症细胞释放的炎症因子在病理过程中扮演着关键角色。在 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠模型中,通过腺病毒介导的 Cry1 过表达可显著降低促炎性细胞因子的表达,包括 IL-1、IL-6、肿瘤坏死因子  $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、核因子  $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)和巨噬细胞炎症蛋白 1 $\alpha$ (macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ )<sup>[20]</sup>。在另一项研究中,Narasimamurthy 等<sup>[32]</sup>发现,在 Cry1 和 Cry2 敲除的小鼠模型中,促炎性细胞因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的产生持续升高。Cry 的缺失可能会减少 Cry1/2 对环磷酸腺苷产生的抑制作用,导致环磷酸腺苷水平升高和蛋白激酶 A 激活增加,随后通过磷酸化 NF- $\kappa$ B 的 S276 位点导致 NF- $\kappa$ B 激活,进而引起炎症水平上升,进一步增加动脉粥样硬化的发生风险<sup>[32]</sup>。

BMAL1 不仅能够抑制炎症细胞的活化,还能够负向调节 Ly6chi 单核细胞的炎症标志物 CCL2 的表达,从而抑制 CCL2/C-C 基序趋化因子受体 2(C-C motif chemokine receptor 2, CCR2)信号通路,延缓动脉粥样硬化的进程<sup>[33]</sup>。此外,BMAL1 参与调节 NF- $\kappa$ B 的激活,调控单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)在巨噬细胞中的昼夜节律表达<sup>[34]</sup>。在 CLOCK 突变型小鼠模型中提取的巨噬细胞显示,CLOCK 突变会促进巨噬细胞促炎性细胞因子的释放增加,包括 IL-12、IL-17 和粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF),这表明 CLOCK 可能具有抑制炎症因子产生和分泌的功能<sup>[17]</sup>。ROR $\alpha$  同样能够控制巨噬细胞和肥大细胞中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的产生,并抑制 NF- $\kappa$ B 的表达<sup>[35]</sup>。

## 2.4 时钟基因与血流动力学异常

血管内膜的血管舒张功能在维持血流动力学稳定方面具有重要作用,血管内膜的损伤被认为是动脉粥样硬化的始发因素。内皮功能障碍会导致相关因子水平的升高,这些因子通过内分泌或旁分泌的方式影响血管平滑肌细胞或血液中的其他成分。内皮细胞产生并释放多种血管活性物质,如内皮素、一氧化氮(nitric oxide, NO)、前列腺素(*prostaglandin I<sub>2</sub>*, PGI<sub>2</sub>)和血管紧张素Ⅱ等,这些物质共同调节血管舒张、血小板聚集以及炎症细胞的浸润<sup>[36]</sup>。其中,内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)通过增加 NO 水平发挥降低血管阻力和血压,抑制血小板聚集的作用,从而保持血管的畅通<sup>[37]</sup>。在生理条件下,清晨 NO 的生成量会降低,NO 依赖的血管发生节律性收缩,这导致心血管事件在清晨更容易发生。有研究表明,在昼夜节律失调时,Per2 与血管老化、血管内皮细胞增殖减少以及血管松弛能力下降之间存在一定关联。该研究揭示了 Per2 突变的小鼠主动脉环中出现了内皮功能障碍的表型,其主要机制是 NO 和 PGI<sub>2</sub> 等内皮源性舒张因子的产生减少,以及环氧合

酶 1 (cyclooxygenase-1, COX-1) 表达的增加<sup>[38]</sup>。

BMAL1 作为时钟基因家族中的关键成员,也参与维持血流动力学的稳定。早期研究发现,BMAL1 敲除的年轻小鼠表现出血管损伤加剧和血流量减少的现象<sup>[39]</sup>。Somanath 等<sup>[40]</sup>发现,在 小鼠中,BMAL1 的缺失主要通过促进血栓前介质如血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)、纤维蛋白原和纤溶酶原激活物抑制物 1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) 的表达,从而加速动脉血栓的形成。进一步研究发现,BMAL1 能够直接调控 vWF 启动子的活性,进而影响内皮细胞中 vWF 的表达<sup>[40]</sup>。研究发现,内皮细胞特异性敲除 BMAL1 的小鼠虽然能维持血压的昼夜节律,但活动期其血压明显低于正常小鼠<sup>[41]</sup>。在内皮细胞和造血细胞中特异性敲除 BMAL1 会导致血管损伤加剧,严重影响血流动力学稳定,为血栓形成提供了条件<sup>[42]</sup>。这些研究表明,血管中的 BMAL1 能够调节血压的节律性波动,并在多种与动脉血流动力学相关的细胞中发挥重要作用。然而,BMAL1 在动脉粥样硬化中的具体分子机制尚不明确,仍需进一步探究(图 2)。

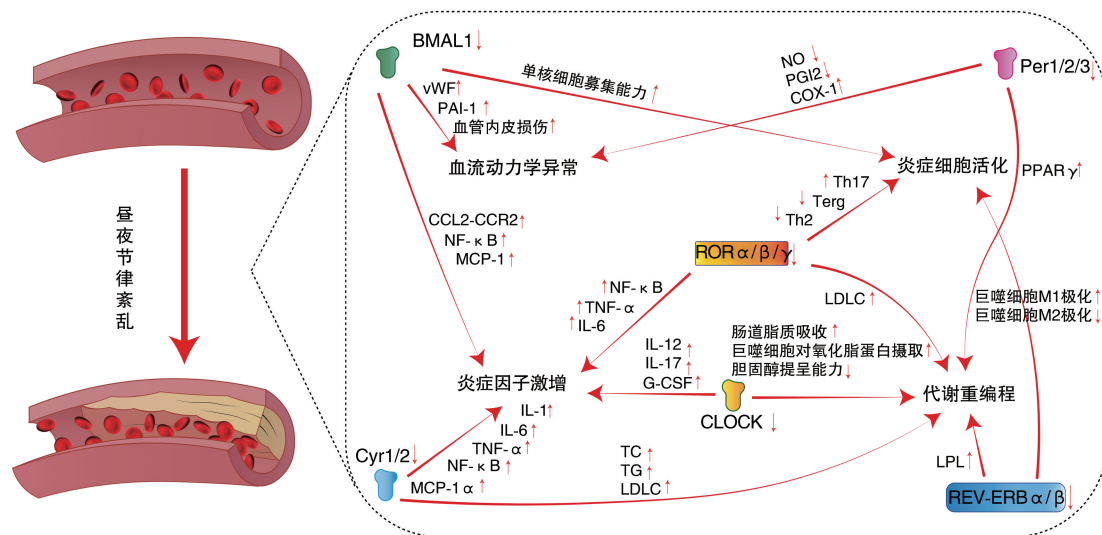


图 2. 病理状态下时钟基因表达紊乱导致动脉粥样硬化的机制图

Figure 2. Mechanism diagram of atherosclerosis caused by disordered clock gene expression under pathological conditions

在动脉粥样硬化的发展过程中,血管平滑肌细胞受到多种促炎性细胞因子的刺激,增殖并迁移到血管内膜,成为血管狭窄的主要原因。在人类颈动脉分离出的血管平滑肌细胞中,时钟基因 BMAL1、Per1、Per2、Per3、Cry1、Cry2 和 REV-ERB $\alpha$  的 mRNA 水平均显示出明显的节律性表达。血管平滑肌细

胞中特异性敲除 BMAL1 的小鼠血压水平显著下降,血压振荡幅度也显著降低,脉压差增大,最终导致血压节律性变化的破坏<sup>[43]</sup>。在血管重塑的过程中,BMAL1 通过激活细胞外调节蛋白激酶的磷酸化,促进血管平滑肌细胞的增殖<sup>[44]</sup>。因此,时钟基因的节律性表达在维持血管的正常生理功能方面

起着至关重要的作用。

### 3 基于时钟基因的抗动脉粥样硬化疗法

时钟基因在动脉粥样硬化的发展中发挥着至关重要的作用,这表明我们可以通过干预时钟基因来控制动脉粥样硬化的进程。一方面,我们能够利用时间疗法实施动脉粥样硬化的初级预防,通过调整与时钟基因相关的因素,如光线、运动、饮食和睡眠时间等,来优化时钟基因的正常表达;另一方面,我们还可以借助生物制剂干预特定基因的表达,实现对动脉粥样硬化更精确的调控。

近年来的研究揭示了多种时钟基因激动剂或抑制剂的存在,其中,REV-ERB 和 ROR 作为受天然配体调控的核激素受体,其靶向药物尤为常见。REV-ERB 激动剂包括 GSK4112、SR9009 和 SR9011,它们能够促进时钟基因 REV-ERB 的表达,并可能在治疗昼夜节律失调、代谢性疾病和睡眠障碍等方面具有潜力<sup>[45-46]</sup>。尽管这些激动剂最初被认为是特异性靶向 REV-ERB 的,对其他靶点无效,但最近研究表明,SR9009 和 SR9011 可能对肝核受体也具有活性<sup>[47]</sup>。因此,关于 REV-ERB 激动剂是否能直接激活 REV-ERB 并发挥作用,目前仍存在争议。ROR 的化学配体种类繁多,例如褪黑素和合成噻唑啉二酮均可激活该受体。其中,Nobiletin 是一种 ROR $\alpha$  的高效激动剂,能够显著提升时钟基因的功能。使用 Nobiletin 可以抑制体质量增加,更有效地控制血糖和血脂水平,而在 CLOCK 敲除的小鼠中,这种保护效应明显减弱<sup>[48]</sup>。由此可见,Nobiletin 主要通过激活 ROR $\alpha$ /CLOCK 信号通路来发挥其保护效应。更值得注意的是,该化合物还能减少高脂饮食喂养的 Ldlr<sup>-/-</sup> 小鼠体内极低密度脂蛋白的生成,减缓动脉粥样硬化的进程<sup>[49]</sup>。因此,以时钟基因为靶点的激动药物为动脉粥样硬化的防治开辟了新的途径。

除了直接激活或调控时钟基因的表达和活性外,我们还可以通过调控与昼夜节律相关的其他基因来对抗动脉粥样硬化。SIRT 家族是一类 NAD<sup>+</sup> 依赖的蛋白质去乙酰化酶,对于维持 BMAL1、ROR $\gamma$ 、Per2 和 Cry1 的昼夜节律性至关重要。特别是沉默信息调节因子 1 (silence information regulator 1, SIRT1),它以昼夜节律的方式与 CLOCK-BMAL1 异二聚体复合物结合,促进 Per2 的去乙酰化和降解,因此在昼夜节律系统中处于核心位置<sup>[50]</sup>。同时,SIRT1 作为天然药物的靶点,近年来受到广泛关注。白藜芦醇作为最早被发现且最受瞩目的 SIRT1 激活

剂,不仅能调节昼夜节律的变化,还能在昼夜节律紊乱时发挥抗动脉粥样硬化的作用<sup>[51]</sup>。SIRT1 作为天然化合物的一个关键靶点,已经有许多已知的激活剂,这是未来治疗由昼夜节律紊乱导致的动脉粥样硬化的新途径。另一个具有治疗昼夜节律紊乱潜力的靶点是 KLF 家族。在 KLF 家族中,Krüppel 样因子 9 (Krüppel-like factor 9, KLF9)、KLF13 和 KLF15 等与昼夜节律紊乱的代谢重编程和免疫相关病理过程紧密相关。KLF 家族在动脉粥样硬化的发病机制中也十分重要,其中主要是 KLF4 和 KLF14 发挥保护作用,KLF4 的缺失会导致巨噬细胞的昼夜节律调控紊乱<sup>[52]</sup>。然而,相关的调控机制和靶向治疗方法仍需要进一步的研究和探索。

利用生物制剂干预时钟基因表达,以实现动脉粥样硬化更精确的调控,这一策略虽然意义重大,但同时也需警惕生物制剂可能带来的不良反应。不同于体内配体和受体一对一的相互作用方式,生物制剂可能以一对多的方式发挥作用。在这些制剂的不良反应用尚不完全了解的情况下,其应用是存在潜在风险的。尽管时钟基因的临床治疗面临诸多挑战,但多项研究已证实时钟基因在动脉粥样硬化治疗中的作用,表明其作为未来潜在治疗靶点具有巨大潜力。

### 4 结 语

上述证据揭示,昼夜节律的紊乱会导致时钟基因表达失调,进而造成糖脂代谢紊乱、血流动力学障碍、单核巨噬细胞系统的异常和炎症因子的爆发。这些病理变化均加速了动脉粥样硬化的进程。尽管当前研究已经阐明了时钟基因在动脉粥样硬化发生和发展过程中的部分病理机制,但采用针对内皮细胞、巨噬细胞和平滑肌细胞的特异性基因敲除模型,将更有助于深入探索时钟基因与动脉粥样硬化之间更详细的分子机制。基于现有的研究成果,未来研究应深入探索动脉粥样硬化的治疗策略,特别是针对时钟基因的新型治疗药物,有望成为防治动脉粥样硬化的新方向。

#### [参考文献]

- [1] GUO J, HUANG X, DOU L, et al. Aging and aging-related diseases: from molecular mechanisms to interventions and treatments [J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7 (1): 391.
- [2] ROTH G A, MENSAH G A, JOHNSON C O, et al. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990-

- 2019; update from the GBD 2019 study [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 76(25): 2982-3021.
- [3] LIBBY P, BURING J E, BADIMON L, et al. Atherosclerosis[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1): 56.
- [4] KONG P, CUI Z Y, HUANG X F, et al. Inflammation and atherosclerosis: signaling pathways and therapeutic intervention [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 131.
- [5] SAMAH N, UGUSMAN A, HAMID A A, et al. Role of matrix metalloproteinase-2 in the development of atherosclerosis among patients with coronary artery disease[J]. *Mediators Inflamm*, 2023, 2023: 9715114.
- [6] GOLDSBOROUGH E 3rd, OSUJI N, BLAHA M J. Assessment of cardiovascular disease risk: a 2022 update [J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2022, 51(3): 483-509.
- [7] PEÑALVO J L, MERTENS E, MUÑOZ-CABREJAS A, et al. Work shift, lifestyle factors, and subclinical atherosclerosis in Spanish male workers: a mediation analysis [J]. *Nutrients*, 2021, 13(4): 1077.
- [8] MORRIS C J, PURVIS T E, HU K, et al. Circadian misalignment increases cardiovascular disease risk factors in humans[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(10): E1402-E1411.
- [9] LOTTI S, PAGLIAI G, COLOMBINI B, et al. Chronotype differences in energy intake, cardiometabolic risk parameters, cancer, and depression: a systematic review with meta-analysis of observational studies[J]. *Adv Nutr*, 2022, 13(1): 269-281.
- [10] COOMANS C P, VAN DEN BERG S A, HOUBEN T, et al. Detrimental effects of constant light exposure and high-fat diet on circadian energy metabolism and insulin sensitivity[J]. *FASEB J*, 2013, 27(4): 1721-1732.
- [11] POURCET B, DUEZ H. Nuclear receptors and clock components in cardiovascular diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(18): 9721.
- [12] MAN A W C, LI H, XIA N. Circadian rhythm: potential therapeutic target for atherosclerosis and thrombosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2): 676.
- [13] MOHAWK J A, GREEN C B, TAKAHASHI J S. Central and peripheral circadian clocks in mammals [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2012, 35: 445-462.
- [14] ZHAO Y, DENG W, WANG Z, et al. P53 regulation upon lipid peroxidation and ferroptosis for intervention against atherogenesis [J]. *Curr Med Chem*, 2024. DOI: 10.2174/0109298673272862231230194711
- [15] CHALFANT J M, HOWATT D A, JOHNSON V B, et al. Chronic environmental circadian disruption increases atherosclerosis and dyslipidemia in female, but not male, apolipoproteinE-deficient mice [J]. *Front Physiol*, 2023, 14: 1167858.
- [16] RUDIC R D, MCNAMARA P, CURTIS A M, et al. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis [J]. *PLoS Biol*, 2004, 2(11): e377.
- [17] PAN X, JIANG X C, HUSSAIN M M. Impaired cholesterol metabolism and enhanced atherosclerosis in clock mutant mice [J]. *Circulation*, 2013, 128(16): 1758-1769.
- [18] CHO H, ZHAO X, HATORI M, et al. Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB- $\alpha$  and REV-ERB- $\beta$  [J]. *Nature*, 2012, 485(7396): 123-127.
- [19] JACOBI D, LIU S, BURKEWITZ K, et al. Hepatic Bmal1 regulates rhythmic mitochondrial dynamics and promotes metabolic fitness [J]. *Cell Metab*, 2015, 22(4): 709-720.
- [20] YANG L, CHU Y, WANG L, et al. Overexpression of CRY1 protects against the development of atherosclerosis via the TLR/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 28(1): 525-530.
- [21] GRIMALDI B, BELLET M M, KATADA S, et al. PER2 controls lipid metabolism by direct regulation of PPAR $\gamma$  [J]. *Cell Metab*, 2010, 12(5): 509-520.
- [22] BILLON C, SITAULA S, BURRIS T P. Inhibition of ROR $\alpha/\gamma$  suppresses atherosclerosis via inhibition of both cholesterol absorption and inflammation [J]. *Mol Metab*, 2016, 5(10): 997-1005.
- [23] TUREK F W, JOSHUA C, KOHSAKA A, et al. Obesity and metabolic syndrome in circadian clock mutant mice [J]. *Science*, 2005, 308(5724): 1043-1045.
- [24] ZANI F, BREASSON L, BECATTINI B, et al. PER2 promotes glucose storage to liver glycogen during feeding and acute fasting by inducing Gys2 PTG and G L expression [J]. *Mol Metab*, 2013, 2(3): 292-305.
- [25] WANG L, LIU H, QIN L, et al. Cytokine storm: the novel mechanism for sleep deprivation-induced multiple organ dysfunction syndrome [J]. *Neurosci Bull*, 2024, 40(7): 1031-1033.
- [26] 杨尧, 闫明静, 徐昆, 等. 代谢重编程: 单核/巨噬细胞训练免疫参与动脉粥样硬化的新机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2023, 31(3): 199-204, 244. YANG Y, YAN M J, XU K, et al. Metabolic reprogramming: a novel mechanism of monocyte/macrophage trained immunity in atherosclerosis [J]. *Chin J Arterioscler*, 2023, 31(3): 199-204, 244.
- [27] CURTIS A M, CHENG Y, KAPOOR S, et al. Circadian variation of blood pressure and the vascular response to asynchronous stress [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(9): 3450-3455.
- [28] ZHU M, TANG H, TANG X, et al. BMAL1 suppresses ROS-induced endothelial-to-mesenchymal transition and atherosclerosis plaque progression via BMP signaling [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(10): 3150-3161.
- [29] HUO M, HUANG Y, QU D, et al. Myeloid Bmal1 deletion increases monocyte recruitment and worsens atherosclerosis [J]. *FASEB J*, 2017, 31(3): 1097-1106.

- [30] MA H, ZHONG W, JIANG Y, et al. Increased atherosclerotic lesions in LDL receptor deficient mice with hematopoietic nuclear receptor Rev-erb $\alpha$  knock-down [J]. J Am Heart Assoc, 2013, 2(4): e000235.
- [31] SITAULA S, BILLON C, KAMENECKA T M, et al. Suppression of atherosclerosis by synthetic REV-ERB agonist [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 460(3): 566-571.
- [32] NARASIMAMURTHY R, HATORI M, NAYAK S K, et al. Circadian clock protein cryptochrome regulates the expression of proinflammatory cytokines [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(31): 12662-12667.
- [33] NGUYEN K D, FENTRESS S J, QIU Y, et al. Circadian gene Bmal1 regulates diurnal oscillations of Ly6C(hi) inflammatory monocytes [J]. Science, 2013, 341(6153): 1483-1488.
- [34] HAYASHI M, SHIMBA S, TEZUKA M. Characterization of the molecular clock in mouse peritoneal macrophages [J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30(4): 621-626.
- [35] NEJATI MOHARRAMI N, BJØRKØY TANDE E, RYAN L, et al. ROR $\alpha$  controls inflammatory state of human macrophages [J]. PLoS One, 2018, 13(11): e0207374.
- [36] ZHAO Y, YU B, WANG Y, et al. Ang-1 and VEGF: central regulators of angiogenesis [J]. Mol Cell Biochem, 2025, 480(2): 621-637.
- [37] 闫明静, 沈涛. 线粒体功能障碍与血管内皮损伤的研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2021, 29(10): 829-837.
- YAN M J, SHEN T. The research progress on mitochondrial dysfunction and vascular endothelial cell injury [J]. Chin J Arterioscler, 2021, 29(10): 829-837.
- [38] VISWAMBHARAN H, CARVAS J M, ANTIC V, et al. Mutation of the circadian clock gene Per2 alters vascular endothelial function [J]. Circulation, 2007, 115(16): 2188-2195.
- [39] CHENG B, ANEA C B, YAO L, et al. Tissue-intrinsic dysfunction of circadian clock confers transplant arteriosclerosis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(41): 17147-17152.
- [40] SOMANATH P R, PODREZ E A, CHEN J, et al. Deficiency in core circadian protein Bmal1 is associated with a prothrombotic and vascular phenotype [J]. J Cell Physiol, 2011, 226(1): 132-140.
- [41] WESTGATE E J, CHENG Y, REILLY D F, et al. Genetic components of the circadian clock regulate thrombogenesis *in vivo* [J]. Circulation, 2008, 117(16): 2087-2095.
- [42] BHATWADEKAR A D, BELI E, DIAO Y, et al. Conditional deletion of Bmal1 accentuates microvascular and macrovascular injury [J]. Am J Pathol, 2017, 187(6): 1426-1435.
- [43] XIE Z, SU W, LIU S, et al. Smooth-muscle BMAL1 participates in blood pressure circadian rhythm regulation [J]. J Clin Invest, 2015, 125(1): 324-336.
- [44] TAKAGURI A, SASANO J, AKIHIRO O, et al. The role of circadian clock gene BMAL1 in vascular proliferation [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 872: 172924.
- [45] SOLT L A, WANG Y, BANERJEE S, et al. Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonists [J]. Nature, 2012, 485(7396): 62-68.
- [46] CHU G, ZHOU X, HU Y, et al. Rev-erb $\alpha$  inhibits proliferation and promotes apoptosis of preadipocytes through the agonist GSK4112 [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(18): 4524.
- [47] GELDOLF L, DEVENTER K, ROELS K, et al. In vitro metabolic studies of REV-ERB agonists SR9009 and SR9011 [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(10): 1676.
- [48] HE B, NOHARA K, PARK N, et al. The small molecule nobiletin targets the molecular oscillator to enhance circadian rhythms and protect against metabolic syndrome [J]. Cell Metab, 2016, 23(4): 610-621.
- [49] MULVIHILL E E, ASSINI J M, LEE J K, et al. Nobiletin attenuates VLDL overproduction, dyslipidemia, and atherosclerosis in mice with diet-induced insulin resistance [J]. Diabetes, 2011, 60(5): 1446-1457.
- [50] ASHER G, GATFIELD D, STRATMANN M, et al. SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation [J]. Cell, 2008, 134(2): 317-328.
- [51] SPALENIK W, CUENDET M. Resveratrol as a circadian clock modulator: mechanisms of action and therapeutic applications [J]. Mol Biol Rep, 2023, 50(7): 6159-6170.
- [52] SHANKMAN L S, GOMEZ D, CHEREPANOVA O A, et al. KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis [J]. Nat Med, 2015, 21(6): 628-637.

(此文编辑 王颖)