

严露,张纓. 骨骼肌特异性 *Chrono* 过表达对小鼠运动能力和糖耐量的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(5): 629-638.
Yan L, Zhang Y. Effect of overexpression of the skeletal muscle-specific *Chrono* gene on exercise capacity and glucose tolerance in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(5): 629-638.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.05.005

骨骼肌特异性 *Chrono* 过表达对小鼠运动能力和糖耐量的影响

严露^{1,2}, 张纓^{2*}

(1. 北京体育大学运动与体质健康教育部重点实验室, 北京 100084; 2. 北京体育大学运动人体科学学院, 北京 100084)

【摘要】 目的 骨骼肌糖代谢水平是影响有氧运动能力的重要因素, 骨骼肌糖代谢水平又受到生物钟的调控。*Chrono* 是近年新发现的生物钟基因, 它可反馈性抑制核心生物钟转录因子 BMAL1 对其下游生物钟靶基因的转录, 被认为是 BMAL1 的转录抑制因子。研究表明 BMAL1 参与骨骼肌糖代谢的调控, 而 *CHRONO* 作为 BMAL1 的转录抑制因子, *CHRONO*-BMAL1 通路对运动能力和糖耐量的影响目前尚未可知。因此, 本研究拟通过骨骼肌特异性 *Chrono* 过表达小鼠和野生型小鼠, 探讨 *CHRONO*-BMAL1 通路对糖耐量和运动能力的影响, 为阐明调节糖耐量与影响骨骼肌健康的新机制提供理论依据。**方法** 健康 8 周龄 C57BL/6N 野生鼠 (WT) 和骨骼肌特异性 *Chrono* 过表达鼠 (TG) 各 20 只, 雌雄各半。记录小鼠体重和摄食量, 进行体成分测试, 对小鼠进行自主活动性测试、递增负荷运动能力测试、葡萄糖耐量测试和抓力测试, 取小鼠骨骼肌称重, 进行实时荧光定量 PCR 检测 *Chrono*、*MyhcI*、*MyhcIIa*、*MyhcIIb*、*MyhcIIx*、*Pdha1* 的 mRNA 表达, 试剂盒检测肌糖原含量。**结果** (1) 与 WT 鼠相比, TG 鼠的自主活动性和递增负荷运动能力均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); (2) 与 WT 鼠相比, TG 鼠腓肠肌、股四头肌、比目鱼肌、趾长伸肌和胫骨前肌重量均明显增加 ($P < 0.01$), TG 雌鼠腓肠肌和股四头肌重量则明显低于 TG 雄鼠 ($P < 0.01$); (3) 与 WT 鼠相比, TG 雄鼠前肢抓力显著下降 ($P < 0.05$), 骨骼肌 *MyhcII* 型 mRNA 表达也明显下降或呈现下降趋势, TG 雌鼠的抓力和 II 型肌纤维 mRNA 的表达则均显著高于 TG 雄鼠 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); (4) 与 WT 鼠相比, TG 鼠糖耐量测试时各点血糖值和曲线下面积均显著升高 ($P < 0.01$), TG 雌鼠则显著低于 TG 雄鼠 ($P < 0.01$); (5) 与 WT 鼠相比, TG 鼠肌糖原含量明显增多 ($P < 0.05$), *Pdha1* mRNA 表达明显减少或呈减少趋势, 而 TG 雌鼠肌糖原含量和 *Pdha1* mRNA 的表达均显著高于 TG 雄鼠 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 骨骼肌 *Chrono* 过表达可降低小鼠自主活动性, 导致糖耐量降低, 并影响有氧运动能力。

【关键词】 *Chrono*; 骨骼肌; 运动能力; 糖耐量

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 05-0629-10

Effect of overexpression of the skeletal muscle-specific *Chrono* gene on exercise capacity and glucose tolerance in mice

YAN Lu^{1,2}, ZHANG Ying^{2*}

(1. Key Laboratory of Sports and Physical Health, Ministry of Education, Beijing 100084, China. 2. College of Human Sport Science, Beijing Sport University, Beijing 100084)
Corresponding author: ZHANG Ying. E-mail: zhyi9256@126.com

【Abstract】 Objective The level of skeletal muscle glucose metabolism is an important factor affecting aerobic exercise capacity, and is regulated by the biological clock. *Chrono* is a newly discovered circadian clock gene. It is involved in the feedback inhibition of transcription of the core circadian clock transcription factor BMAL1 to its downstream circadian clock target genes, and is considered a transcription repressor of BMAL1. Studies have shown that BMAL1 is involved in

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (32071168), 运动与体质健康教育部重点实验室资助项目。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (32071168), Key Laboratory of Sports and Physical Health from Ministry of Education.

[作者简介] 严露 (1994—), 女, 在读博士研究生, 研究方向: 运动与骨骼肌代谢适应。Email: lulusd061@163.com

[通信作者] 张纓 (1961—), 女, 教授, 博士, 博士研究生导师, 研究方向: 运动与骨骼肌代谢适应。Email: zhyi9256@126.com

the regulation of skeletal muscle glucose metabolism. However, CHRONO is a transcription inhibitor of BMAL1, and the effect of the CHRONO-BMAL1 pathway on exercise capacity and glucose tolerance is currently unknown. Therefore, this study employed skeletal muscle-specific *Chrono* overexpression mice and wild-type mice to explore the effect of the CHRONO-BMAL1 pathway on glucose tolerance and exercise capacity. Our findings provide a theoretical basis for elucidating new mechanisms affecting skeletal muscle health. **Methods** In total, 20 healthy 8-week-old C57BL/6N wild-type (WT) mice and 20 skeletal muscle-specific *Chrono* overexpression (*Chrono*-TG) mice (50:50, male; female) were used in this study. Body weight and food intake were recorded. The body composition test, autonomous activity test, incremental load exercise ability test, glucose tolerance test, and grip test were performed. Skeletal muscle was weighed and the mRNA expression levels of the *Chrono*, *Myhcl*, *MyhclIa*, *MyhclIb*, *MyhclIx*, and *Pdha1* genes were detected by Real-time PCR. The content of muscle glycogen was detected using an appropriate kit. **Results** (1) Compared with WT mice, the autonomous mobility and exercise ability of *Chrono*-TG mice were obviously reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); (2) Compared with WT mice, the weights of the gastrocnemius, quadriceps, soleus, extensor digitorum longus, and tibial anterior muscles of TG mice were significantly increased ($P < 0.01$), while the weights of the gastrocnemius and quadriceps femoris of female TG mice were lower than for male TG mice ($P < 0.01$); (3) Compared with WT mice, the strength of the front paw of male TG mice was significantly reduced ($P < 0.05$), and *MyhclIs* mRNA expression in skeletal muscle was also decreased or showed a downward trend. The forepaw grip and *MyhclIs* mRNA expression in female TG mice were clearly higher than in male TG mice ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); (4) Compared with WT mice, the blood glucose value and the area under the curve at each point in the glucose tolerance test of the TG mice were increased ($P < 0.01$), while female TG mice showed lower levels than male TG mice ($P < 0.01$); (5) Compared with WT mice, the content of muscle glycogen in TG mice was increased ($P < 0.05$), and the expression of *Pdha1* mRNA was decreased or showed a decreasing trend, while the muscle glycogen content and *Pdha1* mRNA expression in female TG mice were significantly higher than in male TG mice ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusions** Overexpression of the *Chrono* gene in skeletal muscle can reduce autonomic mobility, impair glucose tolerance, and affect the aerobic exercise capacity of mice.

【Keywords】 *Chrono*; skeletal muscle; exercise capacity; glucose tolerance

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

骨骼肌占人体体重约 40%^[1], 是重要的代谢调节组织, 可将大部分餐后血糖吸收摄取并储存, 对于维持血糖水平的稳定至关重要^[2-4]。骨骼肌糖代谢水平则是影响有氧运动能力的重要因素^[5], 而骨骼肌糖代谢水平会受到生物钟的调控^[6]。BMAL1 (brain and muscle ARNT-like protein 1) 是核心生物钟分子, 可与 CLOCK (circadian locomotor output cycles kaput) 形成 BMAL1-CLOCK 异二聚体, 它们作为转录因子可调控生物钟靶基因的转录^[7-8]。*Chrono* (computationally highlighted repressor of network oscillator, 也称 *Gm129*、*Ciart*、*C1orf51* 等) 是近年新发现的生物钟基因^[9], 其编码的 CHRONO 蛋白可直接与转录因子 BMAL1 相结合, 并反馈性抑制 BMAL1-CLOCK 的转录活性^[10-11], CHRONO-BMAL1 被认为是调控生物节律的重要通路。另外, 研究发现, 骨骼肌生物钟核心分子 BMAL1 参与调节骨骼肌胰岛素敏感性^[12], 调控骨骼肌中糖代谢相关基因表达的节律性变化, 以维持血糖水平稳定^[13], 骨骼肌 BMAL1 缺失则会显著降低骨骼肌葡萄糖摄取^[6,14-15]和糖耐量水平^[16]。因此, BMAL1 不

仅参与骨骼肌生物钟调节, 可能也是调节骨骼肌糖代谢的重要分子。然而, CHRONO 作为 BMAL1 的转录抑制因子, CHRONO-BMAL1 通路是否会对糖耐量产生影响? 进而影响运动能力呢? 这些问题目前未见相关文献报道。

因此, 本研究拟通过骨骼肌特异性 *Chrono* 过表达和野生型小鼠, 探讨 CHRONO-BMAL1 通路对糖耐量和运动能力的影响, 为阐明调节糖耐量与影响骨骼肌健康的新机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

20 只 8 周龄 SPF 级 C57BL/6N 野生鼠 (Wild Type, WT), 其中雄性 10 只, 体重 (22.65 ± 0.21) g, 雌性 10 只, 体重 (18.41 ± 0.13) g。20 只 8 周龄 SPF 级骨骼肌特异性 *Chrono* 过表达鼠 (*Chrono*-TG), 其中雄性 10 只, 体重 (23.16 ± 0.37) g, 雌性 10 只, 体重 (18.69 ± 0.29) g。WT 鼠由北京维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK (京) 2016-

0006】，Chrono-TG 鼠其背景为 C57BL/6N 鼠，由赛业生物科技有限公司制作，中国医学科学院医学实验动物研究所负责繁育【SCXK(京)2019-0011】。

所有小鼠饲养及测试工作均在北京体育大学动物房【SYXK(京)2021-0053】完成。动物房室内温度维持在 25℃ 左右，相对湿度 60% ~ 70%，12 h 光照~12 h 黑暗周期(7:00 开, 19:00 关)。饲养采用国家啮齿类动物标准饲料，整个饲养过程动物可以自由饮水、进食。本研究经北京体育大学运动科学实验伦理委员会批准(批准号:2021042A)。

1.1.2 主要试剂与仪器

血浆胰岛素试剂盒(GEL2579-B, 金恩来, 中国北京), 糖原含量检测试剂盒(BC0345, 索莱宝, 中国北京), RNAiso Plus(9109, TaKaRa, 日本), 逆转录试剂盒(FSQ101, Toyobo, 日本), SYBR Green Realtime PCR Master Mix(QPK-201, Toyobo, 日本), 18S 引物(QT02448075, QIAGEN, 德国)、Chrono 引物(QT01533749, QIAGEN, 德国)。

小动物成分分析仪(Echo-MRI, 美国), 小鼠自主活动转轮笼系统(武汉一鸿科技, 中国), 动物跑台(Columbus Instruments, 美国), 小鼠抓力测试仪(北京众实迪创科技, 中国), 血糖仪及血糖试纸(三诺 GA-6, 中国), 组织研磨仪(Next Advance, 美国), 低温离心机(Eppendorf, 德国), 微量分光光度计(NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, 美国), PCR 扩增仪(A300, LongGene, 中国杭州), 荧光定量 PCR 仪(ABI7500, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 体重、摄食量记录及体成分测试

定时记录各组小鼠每周体重及摄食量。采用小动物脂成分分析仪对各组小鼠的脂肪含量和瘦体重含量进行分析测定。

1.2.2 自主活动性测试

采用小鼠自主活动转轮笼系统连续记录采集黑暗下 72 h 小鼠自主活动情况。

1.2.3 递增负荷运动能力测试

递增负荷运动能力测试参照 Burch 等^[17]的研究并进行了改良。具体如图 1:跑台+5°坡度,以 10 m/min 速度跑 5 min, 6 min 跑速增为 13 m/min, 之后每 3 min 增加跑速 3 m/min, 让小鼠运动至力竭。力竭的判断标准是:小鼠不能维持现有跑速继续运动,机械刺激和电刺激小鼠 10 s 以上仍不能继续运动即判断为力竭。

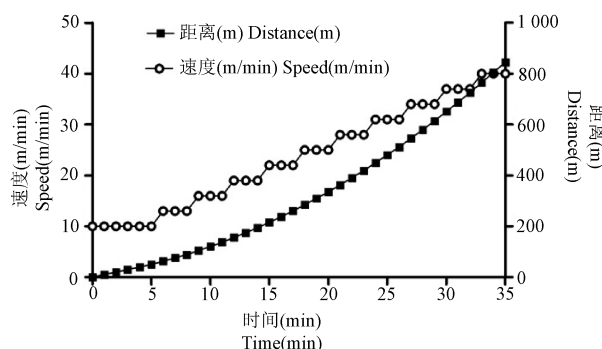


图 1 运动能力测试方案

Figure 1 Exercise capacity test program

1.2.4 抓力测试

先进行 3 d 的抓力测试适应,正式测试时让小鼠两只前爪握住抓力杆,测试者抓住小鼠尾巴让小鼠身体与抓力仪保持平行,并保证小鼠两前爪能持续稳定的发力,记录下持续发力阶段的握力最大值和平均值。

1.2.5 血糖及葡萄糖耐量测试

采集小鼠尾静脉血,测试小鼠在非禁食状态下的血糖值。

葡萄糖耐量试验(glucose tolerance test, GTT):小鼠禁食 8 h 后,根据体重通过腹腔注射 1 g/kg 体重的葡萄糖溶液(100 mg/mL)。检测小鼠尾静脉末梢血糖水平,记录下注射前(0 min)及注射后 15、30、45、60、90 和 120 min 7 个时间点的血糖值。

计算血糖曲线下面积(area under the curve, AUC)=(0 min 血糖值+15 min 血糖值)×15/2+(15 min 血糖值+30 min 血糖值)×15/2+(30 min 血糖值+45 min 血糖值)×15/2+(45 min 血糖值+60 min 血糖值)×15/2+(60 min 血糖值+90 min 血糖值)×30/2+(90 min 血糖值+120 min 血糖值)×30/2。

1.2.6 动物取材及骨骼肌称重

收集小鼠眼眶后静脉血并制备血浆,随后脱颈处死,取心脏、肝和肾,并迅速分离腿部骨骼肌,对各块骨骼肌进行称重记录,随后用锡纸包好编号,投入液氮并转入-80℃保存。

1.2.7 血浆胰岛素测定

按照试剂盒说明书测定小鼠血浆中胰岛素含量。

1.2.8 骨骼肌糖原含量检测

取 50 mg 腓肠肌,按照试剂盒说明书进行糖原提取与测定。

1.2.9 实时荧光定量 PCR

提取腓肠肌总 RNA, 检测目的基因 *Chrono*、肌球蛋白重链 I 型 (*MyhcI*)、肌球蛋白重链 IIa 型 (*MyhcIIa*)、肌球蛋白重链 IIb 型 (*MyhcIIb*)、肌球蛋白重链 IIx 型 (*MyhcIIx*)、丙酮酸脱氢酶 E1 α 亚单位 (*Pdha1*) 的相对表达。除内参 18S 和 *Chrono* 外, 其余引物序列由 Primerbank (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html>) 网站查询获得, 见表 1, 由 Thermo Fisher Scientific 合成。取 50 mg 腓肠肌组织, 加入 800 μ L 预冷的 RNAiso Plus 进行组织研磨, 4 $^{\circ}$ C, 11 304 r/min 离心 10 min 后取上清, 氯仿分相, 取上层无色水相用异丙醇分离 RNA, 4 $^{\circ}$ C, 11 304 r/min 离心 20 min 后用 75% 乙醇洗涤 RNA, 然后进行干燥, 再悬浮, 得到总 RNA 提取液。测定所提 RNA 浓度及纯度, 之后进行逆转录, 反应条件为 65 $^{\circ}$ C, 5 min; 37 $^{\circ}$ C, 15 min; 98 $^{\circ}$ C, 5 min。加入反应体系和相应的引物进行实时荧光定量 PCR 检测。通过仪器自带软件读取实时荧光量 CT 值, 用比较 CT 法对目的基因的表达进行相对定量, 公式如下: 目的基因 = $2^{-\Delta\Delta CT}$ 。

表 1 引物信息

Table 1 Information of primers

引物 Primers	序列 (5' $\rightarrow$ 3') Sequences (5' $\rightarrow$ 3')	长度 (bp) Size (bp)
<i>MyhcI</i>	F: ACTGTCAACACTAAGAGGGTCA R: TTGGATGATTTGATCTTCCAGGG	114
<i>MyhcIIa</i>	F: AAGTGAAGTGTGAAAACAGAAGCA R: GCAGCCATTTGTAAGGGTTGAC	222
<i>MyhcIIb</i>	F: TTGAAAAGACGAAGCAGCGAC R: AGAGAGCGGGACTCTTCTG	190
<i>MyhcIIx</i>	F: GCCAATCGAGGCTCAGAACAA R: GTAGTTCCGCCCTTCGGTCTTG	138
<i>Pdha1</i>	F: GAAATGTGACCTTCATCGGCT R: TGATCCGCCCTTTAGCTCCATC	123

1.3 统计学分析

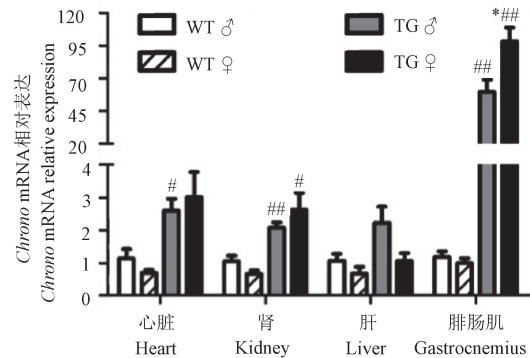
用 SPSS 软件进行数据的统计处理, 结果用平均值 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示。采用独立样本 *t* 检验对数据进行分析, $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 分别代表具有显著性和非常显著性差异。

2 结果

2.1 各组小鼠不同组织 *Chrono* mRNA 表达

在 TG 鼠中, 雌鼠骨骼肌 *Chrono* mRNA 表达显著高出雄鼠 65.36%; 与 WT 鼠比, 其雄、雌鼠的心脏和肾中 *Chrono* mRNA 的表达略高, *Chrono*-TG 雄鼠

心脏和肾中 *Chrono* mRNA 表达分别为 WT 雄鼠的 2.6 倍和 2.07 倍, TG 雌鼠肾中 *Chrono* mRNA 表达为 WT 雌鼠的 3.98 倍, 而 TG 鼠腓肠肌 (gastrocnemius) 的 *Chrono* mRNA 表达则非常显著地高于 WT 鼠, 雄鼠高 49.88 倍, 雌鼠高 99.45 倍 (图 2)。



注: 与各相应雄鼠比, * $P < 0.05$; 与 WT 鼠相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。(下同)

图 2 不同组织 *Chrono* mRNA 表达

Note. Compared with the corresponding male mice, * $P < 0.05$. Compared with WT, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 2 *Chrono* mRNA expression in different tissues

2.2 各组小鼠体重、摄食量及体成分变化

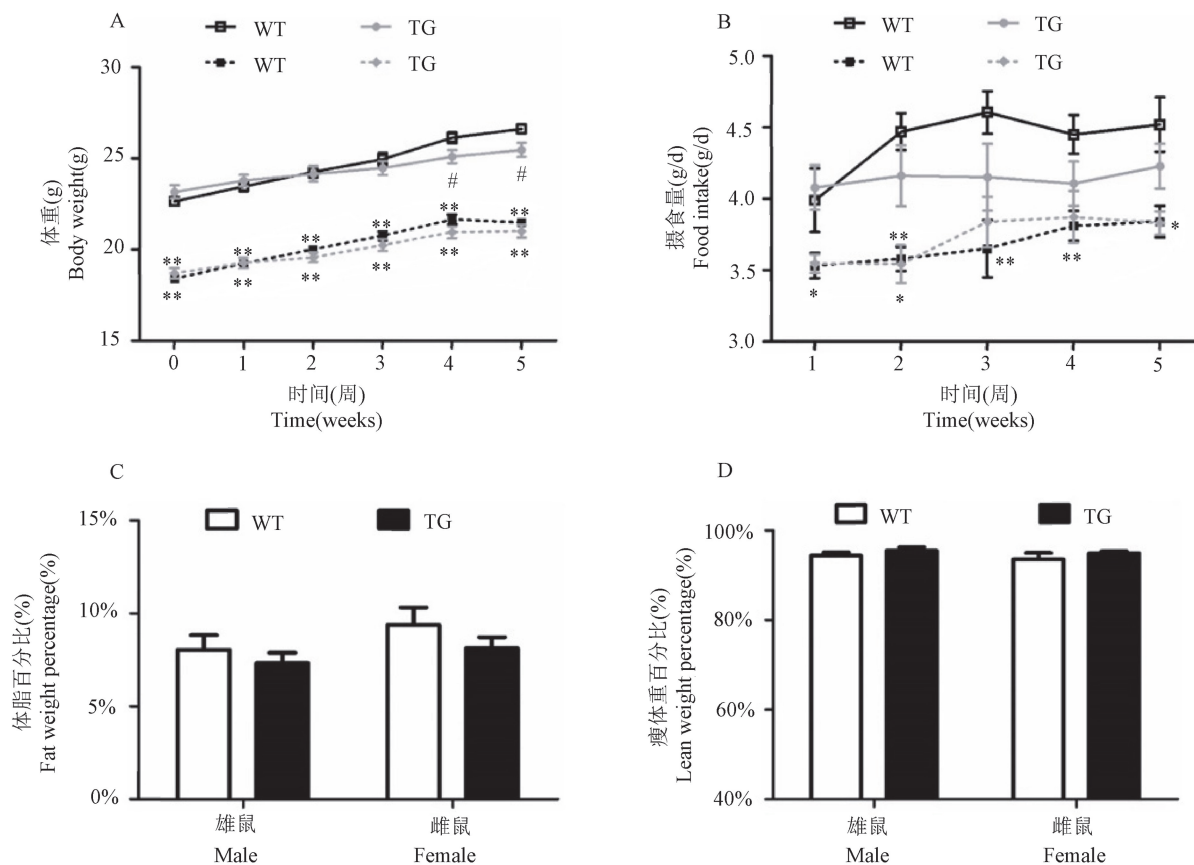
在 *Chrono*-TG 鼠中, 雌鼠体重从 (18.69 $\pm$ 0.29) g 增长至 (21.00 $\pm$ 0.35) g, 雄鼠体重从 (23.16 $\pm$ 0.37) g 增长至 (25.46 $\pm$ 0.39) g, 整个饲养周期中雌鼠体重始终显著低于雄鼠 ($P < 0.01$), TG 雌鼠在第 1、2 周摄食量明显低于雄鼠 ($P < 0.05$), 体脂百分比和瘦体重百分比则无明显变化; 在 WT 鼠中, 雌鼠体重从 (18.41 $\pm$ 0.13) g 增长至 (21.49 $\pm$ 0.21) g, 雄鼠则从 (22.65 $\pm$ 0.21) g 增长至 (26.62 $\pm$ 0.25) g, 雌鼠体重始终显著低于雄鼠 ($P < 0.01$), 且雌鼠在第 2、3、4、5 周的摄食量均显著低于雄鼠 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。 *Chrono*-TG 雄鼠体重在第 4、5 周分别为 (25.09 $\pm$ 0.36) g 和 (25.46 $\pm$ 0.39) g, WT 雄鼠体重在第 4、5 周则为 (26.13 $\pm$ 0.30) g 和 (26.62 $\pm$ 0.25) g, 在这两周 TG 雄鼠体重明显低于 WT 雄鼠 ($P < 0.05$) (图 3)。

2.3 各组小鼠自主活动变化

图 4A 可以看出, TG 鼠中雄鼠自主转轮活动总量为 (20 628.91 $\pm$ 2 108.31) m, 雌鼠自主转轮活动总量为 (25 323.53 $\pm$ 2 772.84) m, 雌雄并无明显差异, WT 鼠中雄鼠自主转轮活动总量为 (30017.26 $\pm$ 1913.43) m, 雌鼠为 (35920.16 $\pm$ 1131.04) m, 雌性

活动总量显著高于雄性 ($P < 0.05$); TG 鼠与 WT 鼠相比, 雌、雄鼠的自主转轮活动总量均显著降低 ($P < 0.01$)。图 4B 显示, 在 TG 鼠中, 其雄鼠和雌鼠在全天 24 h 内的转轮活动量无显著变化, 在 WT 鼠

中, 雌鼠在夜晚 (19:00 ~ 7:00) 明显高于雄鼠 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); TG 鼠与 WT 鼠相比, 雌、雄鼠在夜晚的转轮活动量均明显减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

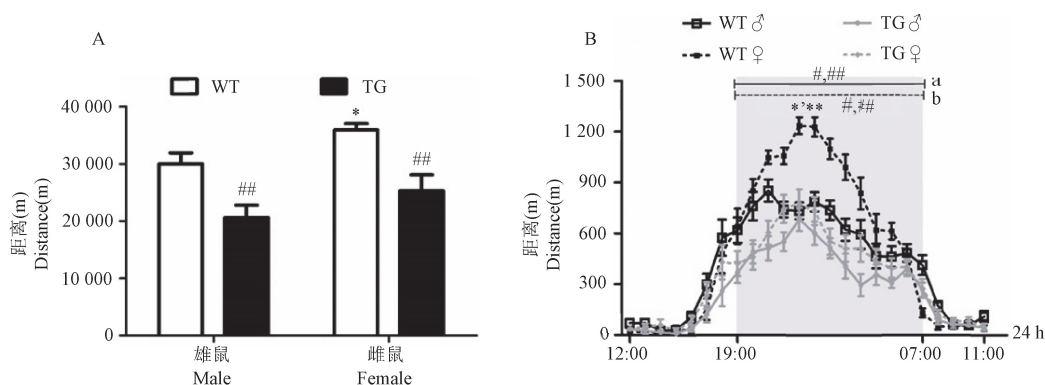


注: 与各相应雄鼠相比, ** $P < 0.01$ 。(下图同)

图 3 体重、摄食量及体成分变化

Note. Compared with the corresponding male mice, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 3 Changes of body weight, food intake and body composition



注: A: 小鼠自主转轮总活动量; B: 每小时平均转轮活动量, a: TG 雄鼠与 WT 雄鼠相比, b: WT 雌鼠与 WT 雄鼠、TG 雌鼠与 WT 雌鼠相比。

图 4 自主活动变化

Note. A. Total amount of autonomous activity. B. Average amount of voluntary activity per hour. a. Represents the comparison between TG male mice and WT male mice. b. Represents the comparison between WT female mice and WT male mice, and TG female mice and WT female mice.

Figure 4 Change of autonomous activity

2.4 各组小鼠跑台运动能力变化

从图 5 知,在 TG 鼠中,雄鼠进行递增负荷至力竭的运动时间为 (43.76 ± 1.57) min,运动距离为 (1218.81 ± 77.53) m,雌鼠运动时间为 (44.17 ± 1.14) min,运动距离为 (1233.35 ± 57.90) m,雌雄

之间无明显变化;WT 雄鼠运动时间为 (51.34 ± 1.35) min,距离为 (1608.34 ± 75.22) m,WT 雌鼠运动时间为 (48.78 ± 1.81) min,距离为 (1480.42 ± 96.47) m,与 WT 鼠比,TG 鼠其雌、雄鼠运动时间和距离均显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

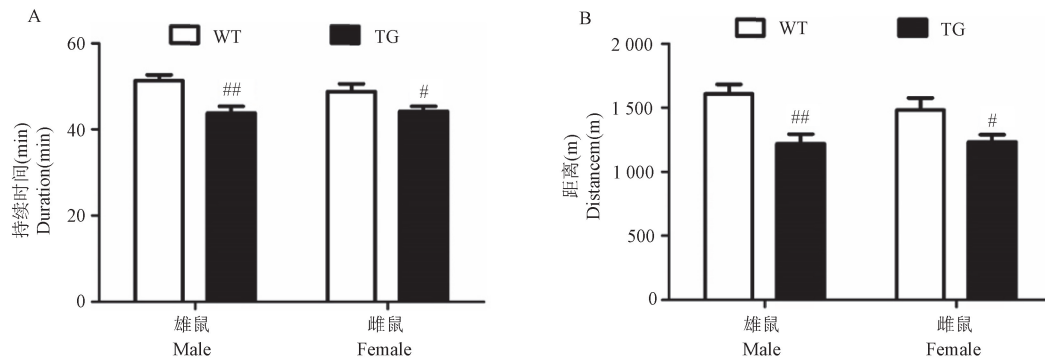


图 5 递增负荷至力竭的运动时间和运动距离变化

Figure 5 Changes of time and distance of incremental load to exhaustion

2.5 各组小鼠葡萄糖耐量、非禁食血糖和胰岛素浓度变化

如图 6A 所示,在 TG 鼠中,雌鼠在第 30、45、60、90、120 min 的血糖值显著低于雄鼠($P < 0.01$),WT 鼠中,雌鼠在第 0、30、45、60、90、120 min 的血糖值明显低于雄鼠($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);TG 鼠与 WT 鼠相比,其雌、雄鼠在第 15、30、45、60、90、120 min 这 6 个时间点的血糖值都显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。图 6B 显示,TG 雄鼠 GTT 曲线下面积(AUC)为 (1161.82 ± 25.56) ,TG 雌鼠 AUC 为 (1028.58 ± 18.30) ,WT 雄鼠 AUC 为 (1004.68 ± 20.25) ,WT 雌鼠 AUC 为 (897.64 ± 22.34) 。在 TG 鼠和 WT 鼠中,雌鼠 AUC 均显著低于雄鼠($P < 0.01$),TG 鼠与 WT 鼠相比,其雌、雄鼠 AUC 均显著升高($P < 0.01$)。图 6C 和 6D 可以看出,TG 鼠中雌鼠非禁食血糖为 (6.58 ± 0.25) mmol/L,血浆胰岛素浓度为 (9.79 ± 0.17) mIU/L,雄鼠非禁食血糖为 (6.91 ± 0.12) mmol/L,胰岛素为 (9.69 ± 0.18) mIU/L,雌雄之间无明显差异,WT 鼠中雌鼠非禁食血糖为 (6.22 ± 0.13) mmol/L,显著低于雄鼠的 (6.93 ± 0.24) mmol/L($P < 0.05$)。

2.6 各组小鼠抓力、骨骼肌重量及肌纤维类型 mRNA 表达变化

图 7A 表明,在 TG 鼠中,雌鼠抓力相对最大值 (2.40 ± 0.11) ,相对平均值 (2.09 ± 0.07) ,明显高于雄鼠最大值 (2.04 ± 0.08) 和平均值 $(1.75 \pm$

$0.06)$ ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与 WT 雄鼠抓力最大值 (2.35 ± 0.10) ,平均值 (2.04 ± 0.08) 相比,TG 雄鼠抓力最大值和平均值显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。图 7B 中显示,TG 雌鼠腓肠肌和股四头肌相对重量为 (5.93 ± 0.08) 和 (7.93 ± 0.11) ,显著低于 TG 雄鼠的 (6.44 ± 0.08) 和 (8.41 ± 0.10) ($P < 0.01$),WT 鼠中雌鼠的腓肠肌和股四头肌相对重量为 (5.40 ± 0.08) 和 (7.38 ± 0.10) ,显著低于 WT 雄鼠的 (5.72 ± 0.06) 和 (7.76 ± 0.09) ($P < 0.01$);TG 鼠与 WT 鼠比,其雌、雄鼠腓肠肌、比目鱼肌、趾长伸肌、胫骨前肌和股四头肌的相对重量都明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。图 7C 和 7D 显示,TG 鼠中,雌鼠和雄鼠骨骼肌 *MyhcI* 的 mRNA 表达无明显变化,雌鼠 *MyhcIIa*、*MyhcIIb* 和 *MyhcIIx* 的 mRNA 表达则明显多于雄鼠($P < 0.05$),分别高 0.54、0.38 和 0.33 倍,WT 鼠中雌鼠 *MyhcIIa* 的 mRNA 表达显著高于雄鼠 0.41 倍($P < 0.01$);TG 鼠与 WT 鼠比,其雄鼠 *MyhcIIa* 和 *MyhcIIb* 的 mRNA 表达显著降低 32.35% 和 29.41% ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),雌鼠 *MyhcIIa* mRNA 表达明显减少 26.39% ($P < 0.05$)。

2.7 各组小鼠肌糖原含量和骨骼肌丙酮酸脱氢酶(Pdha1) mRNA 表达变化

由图 8A 可看出,TG 雌鼠肌糖原含量为 (0.0120 ± 0.0009) mg,TG 雄鼠为 (0.0092 ± 0.0002) mg,WT 雌鼠肌糖原含量为 $(0.0099 \pm$

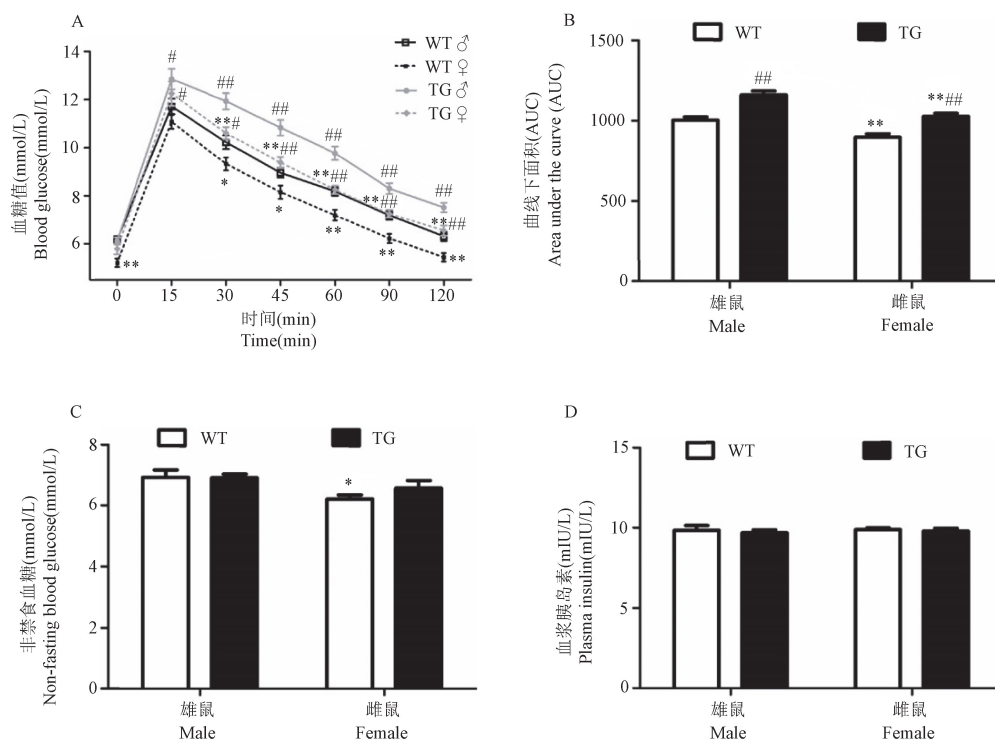
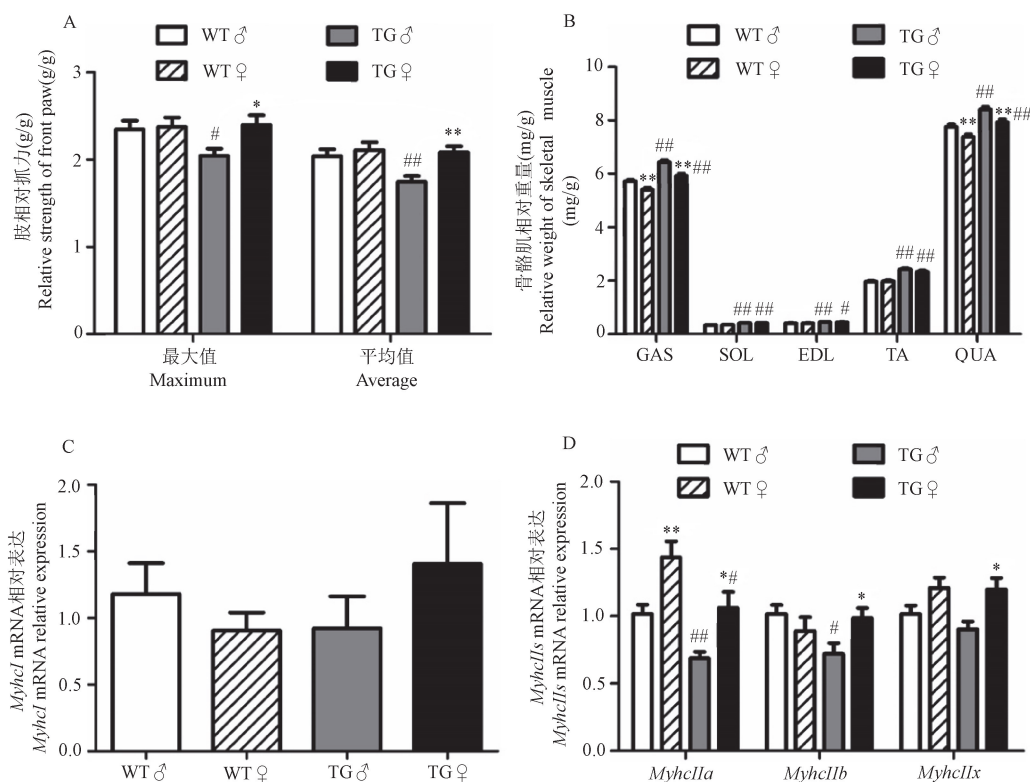


图 6 葡萄糖耐量、非禁食血糖和胰岛素浓度变化

Figure 6 Changes of glucose tolerance, non-fasting blood glucose and plasma insulin concentration



注: GAS: 腓肠肌; SOL: 比目鱼肌; EDL: 趾长伸肌; TA: 胫骨前肌; QUA: 股四头肌。

图 7 抓力、骨骼肌重量及肌纤维类型 mRNA 表达变化

Note. GAS. Gastrocnemius. SOL. Soleus. EDL. Extensor digitorum longus. TA. Tibialis anterior. QUA. Quadriceps.

Figure 7 Changes of strength of front paw, muscle weight and muscle fiber type mRNA expression

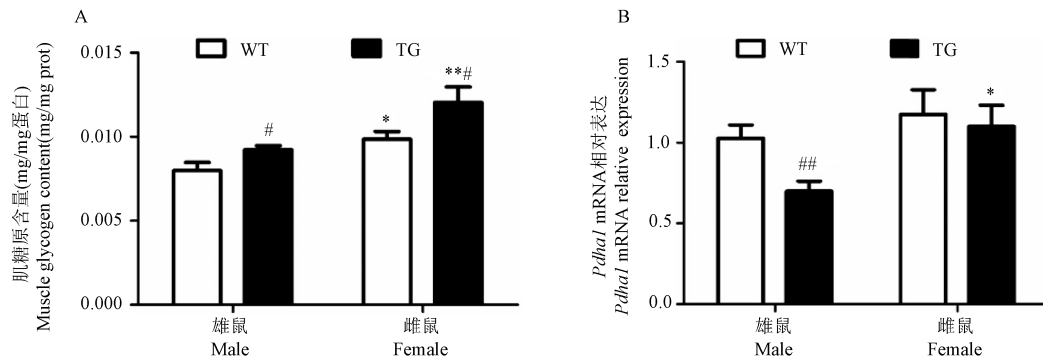


图8 肌糖原含量和骨骼肌丙酮酸脱氢酶 mRNA 表达的变化

Figure 8 Changes of muscle glycogen content and skeletal muscle pyruvate dehydrogenase mRNA expression

0.0005) mg, WT 雄鼠则为 (0.0080 ± 0.0005) mg。在 TG 鼠和 WT 鼠中,雌鼠肌糖原含量均明显高于雄鼠 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);TG 鼠与 WT 鼠相比,其雌、雄鼠肌糖原含量均显著增多 ($P < 0.05$)。图 8B 显示,TG 鼠中雌鼠骨骼肌 *Pdha1* mRNA 表达显著多于雄鼠 0.57 倍 ($P < 0.05$);TG 鼠与 WT 鼠相比,雄鼠骨骼肌中 *Pdha1* mRNA 表达显著降低 32.04% ($P < 0.01$)。

3 讨论

Chrono 是近年来在哺乳动物中新发现的生物钟基因^[18-19]。*Chrono* 可影响小鼠昼夜节律周期^[9]。研究表明,*Chrono* 是 BMAL1 的靶基因,*Chrono* 编码的 CHRONO 蛋白可以和内源性 BMAL1 相结合,并能抑制 BMAL1-CLOCK 对其生物钟靶基因的转录活性^[10-11]。因此,CHRONO 蛋白被认为是 BMAL1 的转录抑制因子,CHRONO-BMAL1 通路也是调控生物节律的重要通路^[20]。

3.1 骨骼肌 *Chrono* 过表达对小鼠自主活动节律性的影响

本研究对该鼠不同组织器官进行 *Chrono* mRNA 表达的检测,发现在心脏、肾和肝中 *Chrono* mRNA 的表达与 WT 鼠相比虽有所提高但倍数较小,而腓肠肌中 *Chrono* mRNA 的表达高于 WT 鼠约 50 ~ 100 倍,并表现出了较大的性别差异。表明该鼠确实是骨骼肌特异性 *Chrono* 过表达鼠。

该研究对骨骼肌特异性 *Chrono*-TG 鼠进行自主活动节律性测试,利用自主转轮笼系统连续记录小鼠的运动情况,发现在 3 d 全黑时间里,TG 鼠总活动量显著低于 WT 鼠,而在 24 h 的昼夜周期中,7:00 ~ 19:00 为休息期,活动量较少,在 19:00 ~ 7:00 为活跃期,TG 鼠活动量明显低于 WT 鼠,TG

鼠其雌、雄鼠总活动量和活跃期活动量并无明显差异。表明骨骼肌 *Chrono* 过表达可显著降低小鼠的自主活动性,而这种影响并无性别差异。

3.2 骨骼肌 *Chrono* 过表达对小鼠体重、摄食及体成分的影响

本研究观察了骨骼肌 *Chrono* 过表达对小鼠体重、摄食量和体成分的影响,发现在摄食量和体成分上,TG 鼠和 WT 鼠无显著差异,而体重在饲养第 4、5 周出现 TG 雄鼠明显低于 WT 雄鼠的现象,这可能与 TG 雄鼠摄食量始终偏低有关,导致其体重增长速度低于 WT 雄鼠,从而在饲养后期出现体重差异增加。此外,两种鼠在 5 周饲养期内体重和摄食量均出现明显的性别差异,即雌鼠体重明显低于雄鼠,摄食量总体上低于雄鼠,而体脂百分比和瘦体重百分比无性别差异。以上表明,骨骼肌 *Chrono* 过表达对小鼠体重、摄食量和体成分影响不大。

3.3 骨骼肌 *Chrono* 过表达对小鼠运动能力、抓力和肌纤维类型的影响

研究发现,核心生物钟基因 *Bmal1* 的表达可影响机体的运动能力。*Bmal1* 基因敲除鼠与同窝对照鼠相比,白天进行耐力运动的时间明显增加,晚上则无变化^[21]。骨骼肌特异性 *Bmal1* 基因敲除鼠与同窝对照鼠相比,跑台测试中的运动距离和运动时间都显著升高^[22]。然而也有研究表明,*Bmal1* 基因与运动能力关系不大。骨骼肌特异性 *Bmal1* 基因过表达小鼠在进行递增负荷运动能力测试时的运动表现及最大摄氧量与野生鼠并无差异^[23]。

CHRONO 作为 BMAL1 的转录抑制因子,其对运动能力的影响目前尚不明确,因此,本研究采用骨骼肌特异性 *Chrono* 过表达鼠和 WT 鼠,进行跑台递增负荷至力竭的运动能力测试,TG 鼠运动至力竭的时间和距离均明显低于 WT 鼠,TG 鼠递增负荷运

动至力竭的运动能力无性别差异。表明骨骼肌 *Chrono* 过表达可显著降低小鼠有氧运动能力。

生物钟基因 *Bmal1* 还可影响骨骼肌重量及肌纤维类型。*Bmal1* 敲除会使小鼠肌肉力量下降,粗肌丝的超微结构出现损坏,甚至出现严重的肌肉萎缩等^[24-26]。非诱导型和可诱导型骨骼肌特异性 *Bmal1* 敲除小鼠,均表现出正常的骨骼肌形态及超微结构,同时肌肉重量略有增加,肌纤维横截面积也更大,但肌肉力量有所下降,快肌纤维比例减少^[14,27]。

而 *Chrono* 基因是否也会对骨骼肌产生影响呢?目前尚不清楚。因而本研究对小鼠骨骼肌相关指标进行检测,发现 TG 鼠其雌、雄鼠的腓肠肌、比目鱼肌、趾长伸肌、胫骨前肌和股四头肌的相对重量都明显高于 WT 鼠,骨骼肌相对重量也表现出性别差异,WT 雌鼠和 TG 雌鼠的腓肠肌与股四头肌相对重量均显著低于各自雄鼠。此外,对小鼠前肢的抓力测试显示,TG 雄鼠的抓力显著低于 WT 雄鼠,两种雌鼠间无明显差异,而雌性 TG 鼠抓力则显著大于雄性 TG 鼠。TG 雄鼠的骨骼肌相对重量较大,但其抓力却较小,其原因可能与骨骼肌纤维类型的改变有关,而持续较短时间的前肢抓力则更多与快肌纤维相关^[28]。本研究对小鼠腓肠肌纤维类型进行 mRNA 表达检测发现,慢肌纤维即 *MyhcI* 型在 TG 鼠和 WT 鼠中并无较大变化,但快肌纤维即 *MyhcII* 型的差异却比较明显,TG 雄鼠的 *MyhcIIa* 和 *MyhcIIb* 型肌纤维表达显著低于 WT 雄鼠,TG 雌鼠 3 种 II 型肌纤维的表达均高于 TG 雄鼠,这可能是造成 TG 雄鼠抓力比 WT 雄鼠和 TG 雌鼠均较差的原因。

3.4 骨骼肌 *Chrono* 过表达对小鼠糖耐量、肌糖原和骨骼肌丙酮酸脱氢酶 (*Pdha1*) mRNA 表达的影响

核心生物钟基因 *Bmal1* 被证实可显著影响骨骼肌糖代谢功能。细胞实验表明,沉默 *Bmal1* 基因会减弱 C2C12 细胞的胰岛素信号通路作用,产生明显的胰岛素抵抗^[12]。动物实验表明,骨骼肌 *Bmal1* 特异性敲除可显著下调糖代谢相关基因 mRNA 表达,使骨骼肌糖酵解作用减弱,葡萄糖吸收利用减少和糖耐量水平下降^[13-14,16]。而骨骼肌 *Bmal1* 过表达会降低急性睡眠剥夺后小鼠骨骼肌的胰岛素敏感性^[29]。

本研究发现,CHRONO 作为 BMAL1 的转录抑制因子,与 BMAL1 相同也会小鼠糖耐量水平产

生显著影响。TG 鼠糖耐量血糖值及曲线下面积都明显高于 WT 鼠,并且在 WT 鼠和 TG 鼠中都呈现出非常明显的性别差异,即雌鼠的糖耐量血糖值和曲线下面积显著低于雄鼠,而在血浆胰岛素和非禁食血糖方面,TG 鼠与 WT 鼠相比并无异常。同时 TG 雌、雄鼠肌糖原含量均明显高于 WT 鼠,出现肌糖原大量积累的情况,而 TG 雄鼠丙酮酸脱氢酶 *Pdha1* mRNA 的表达显著低于 WT 雄鼠,丙酮酸脱氢酶是糖酵解进入三羧酸循环的关键^[30],其表达减少提示糖有氧氧化过程受到抑制。另外,两种雌鼠的肌糖原均明显高于各自相应雄鼠,*Pdha1* mRNA 的表达也高于雄鼠或有升高的趋势,这可能是造成小鼠糖耐量出现性别差异的原因之一。以上结果表明,骨骼肌 *Chrono* 过表达可导致小鼠肌糖原堆积,骨骼肌 *Pdha1* mRNA 表达减少,糖耐量异常。

骨骼肌 *Chrono* 过表达可降低小鼠自主活动性,导致糖耐量降低,并影响有氧运动能力。

参 考 文 献 (References)

- [1] Kim KM, Jang HC, Lim S. Differences among skeletal muscle mass indices derived from height-, weight-, and body mass index-adjusted models in assessing sarcopenia [J]. Korean J Intern Med, 2016, 31(4): 643-650.
- [2] DeFronzo RA, Tripathy D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes [J]. Diabetes Care, 2009, 32(2): 157-163.
- [3] Ferrannini E, Simonson DC, Katz LD, et al. The disposal of an oral glucose load in patients with non-insulin-dependent diabetes [J]. Metabolism, 1988, 37(1): 79-85.
- [4] Thiebaud D, Jacot E, DeFronzo RA, et al. The effect of graded doses of insulin on total glucose uptake, glucose oxidation, and glucose storage in man [J]. Diabetes, 1982, 31(11): 957-963.
- [5] Hearris MA, Hammond KM, Fell JM, et al. Regulation of muscle glycogen metabolism during exercise: implications for endurance performance and training adaptations [J]. Nutrients, 2018, 10(3): 298.
- [6] Yin H, Li W, Chatterjee S, et al. Metabolic-sensing of the skeletal muscle clock coordinates fuel oxidation [J]. FASEB J, 2020, 34(5): 6613-6627.
- [7] O'Neill JS, van Ooijen G, Dixon LE, et al. Circadian rhythms persist without transcription in a eukaryote [J]. Nature, 2011, 469(7331): 554-558.
- [8] 肖邦, 崔淑芳. 体外培养细胞生物节律研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(11): 61-66.
Xiao B, Cui SF. Research progress of biological rhythm of cell cultured *in vitro* [J]. Chin J Comp Med, 2014, 24(11): 61-66.
- [9] Anafi RC, Lee Y, Sato TK, et al. Machine learning helps

- identify CHRONO as a circadian clock component [J]. *PLoS Biol*, 2014, 12(4): e1001840.
- [10] Goriki A, Hatanaka F, Myung J, et al. A novel protein, CHRONO, functions as a core component of the mammalian circadian clock [J]. *PLoS Biol*, 2014, 12(4): e1001839.
- [11] Annayev Y, Adar S, Chiou YY, et al. Gene model 129 (Gm129) encodes a novel transcriptional repressor that modulates circadian gene expression [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(8): 5013–5024.
- [12] Liu J, Zhou B, Yan M, et al. CLOCK and BMAL1 regulate muscle insulin sensitivity via SIRT1 in male mice [J]. *Endocrinology*, 2016, 157(6): 2259–2269.
- [13] Hodge BA, Wen Y, Riley LA, et al. The endogenous molecular clock orchestrates the temporal separation of substrate metabolism in skeletal muscle [J]. *Skelet Muscle*, 2015, 5(1): 17.
- [14] Dyar KA, Ciciliot S, Wright LE, et al. Muscle insulin sensitivity and glucose metabolism are controlled by the intrinsic muscle clock [J]. *Mol Metab*, 2014, 3(1): 29–41.
- [15] Schiaffino S, Blaauw B, Dyar KA, et al. The functional significance of the skeletal muscle clock: lessons from *Bmal1* knockout models [J]. *Skelet Muscle*, 2016, 6(1): 33.
- [16] Harfmann BD, Schroder EA, Kachman MT, et al. Muscle-specific loss of *bmal1* leads to disrupted tissue glucose metabolism and systemic glucose homeostasis [J]. *Skelet Muscle*, 2016, 6: 12.
- [17] Burch N, Arnold AS, Item F, et al. Electric pulse stimulation of cultured murine muscle cells reproduces gene expression changes of trained mouse muscle [J]. *PLoS One*, 2010, 5(6): e10970.
- [18] Hatanaka F, Matsubara C, Myung J, et al. Genome-wide profiling of the core clock protein BMAL1 targets reveals a strict relationship with metabolism [J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(24): 5636–5648.
- [19] Rey G, Cesbron F, Rougemont J, et al. Genome-wide and phase-specific DNA-binding rhythms of BMAL1 control circadian output functions in mouse liver [J]. *PLoS Biol*, 2011, 9(2): e1000595.
- [20] Robinson R. Chronos: stress makes the clock tick [J]. *PLoS Biol*, 2014, 12(4): e1001838.
- [21] Adamovich Y, Dandavate V, Ezagouri S, et al. Clock proteins and training modify exercise capacity in a daytime-dependent manner [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(35): e2101115118.
- [22] Wada T, Ichihashi Y, Suzuki E, et al. Deletion of *Bmal1* prevents diet-induced ectopic fat accumulation by controlling oxidative capacity in the skeletal muscle [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(9): 2813.
- [23] Brager AJ, Heemstra L, Bhambra R, et al. Homeostatic effects of exercise and sleep on metabolic processes in mice with an overexpressed skeletal muscle clock [J]. *Biochimie*, 2017, 132: 161–165.
- [24] Kondratov RV, Kondratova AA, Gorbacheva VY, et al. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(14): 1868–1873.
- [25] Musiek ES, Lim MM, Yang G, et al. Circadian clock proteins regulate neuronal redox homeostasis and neurodegeneration [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(12): 5389–5400.
- [26] Khapre RV, Kondratova AA, Susova O, et al. Circadian clock protein BMAL1 regulates cellular senescence *in vivo* [J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(23): 4162–4169.
- [27] Schroder EA, Harfmann BD, Zhang X, et al. Intrinsic muscle clock is necessary for musculoskeletal health [J]. *J Physiol*, 2015, 593(24): 5387–5404.
- [28] 王瑞元, 苏全生. 运动生理学 [M]. 北京: 人民体育出版社; 2011.
- Wang RY, Su QS. *Sports Physiology* [M]. Beijing: People's Sports Publishing House; 2011.
- [29] Ezagouri S, Zwigah Z, Sobel J, et al. Physiological and molecular dissection of daily variance in exercise capacity [J]. *Cell Metab*, 2019, 30(1): 78–91.
- [30] 郑集, 陈钧辉. 普通生物化学 [M]. 北京: 高等教育出版社; 2007.
- Zheng J, Chen JH. *General Biochemistry* [M]. Beijing: Higher Education Press; 2007.

[收稿日期] 2021-12-10