

过度劳累损伤小鼠心肌能量代谢稳态

崔俊杰¹, 赖睿茵¹, 陈苏衡¹, 瞿珊珊¹, 廖阅¹, 马雪¹, 李玉兰²

¹兰州大学第一临床医学院, 甘肃 兰州 730000; ²兰州大学第一医院麻醉手术科, 甘肃 兰州 730000

摘要:目的 探讨过度劳累对小鼠心肌能量代谢的影响。方法 32只C57BL/6J小鼠被随机分为4组($n=8$):对照组、过劳2周(W2)组、过劳4周(W4)组和过劳6周(W6)组, W2、W4和W6组每天强迫水中站立8 h+束缚3 h, 分别连续造模2周、4周和6周, 每周记录小鼠体质量, 并观察一般情况。造模结束后行超声心动图, 并检测血脂和血糖水平, HE染色观察心肌组织病理学变化, ELISA法检测心肌甘油三酯(TG)、三磷酸腺苷(ATP)水平, 免疫组化染色检测心肌组织分化簇36(CD36)和葡萄糖易化扩散转运蛋白1(GLUT1)的表达, RT-qPCR和Western blotting分析心肌脂代谢调控因子肉碱棕榈酰转移酶1B(CPT1B)和过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α), 糖酵解酶磷酸果糖激酶(PFKM)和丙酮酸激酶M2(PKM2)的mRNA表达水平和蛋白相对表达量。结果 小鼠随着过劳时间延长逐渐表现出活动减少、毛发脱落、皮毛晦暗以及体质量增长迟缓现象, 但心脏指数及心功能无显著改变($P>0.05$); 与CON组相比, W2和W4组血糖水平升高($P<0.001$), 而W6组降低($P<0.001$), W4和W6组血清TG水平持续上升($P<0.001$), 而TC、HDL和LDL水平均降低($P<0.01$); 过劳导致心肌细胞肿胀、排列紊乱、疏松和空泡化, 与CON组相比, W4和W6组心肌TG水平升高($P<0.001$), W6组ATP水平降低($P<0.05$); 与CON组相比, W4和W6组CPT1B和PPAR α mRNA及蛋白表达持续下调($P<0.05$ 或 $P<0.01$ 或 $P<0.001$), W4组CD36蛋白反而表达增加($P<0.05$); 此外, W2组GLUT1蛋白及PFKM、PKM2 mRNA和蛋白表达降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$ 或 $P<0.001$), 但W4和W6组较W2组又有所增加($P<0.01$)。结论 过劳初期小鼠血糖水平升高, 并伴有心肌糖酵解受到抑制; 持续过劳导致血糖水平下降, 血TG水平升高, 而TC、HDL和LDL水平降低, 同时心肌脂肪酸氧化能力受损、加之糖酵解供能有限, 最终引起心肌结构损伤、TG堆积和ATP水平下降。

关键词:过度劳累; 心肌; 能量代谢; 脂肪酸氧化; 糖酵解

Overwork damages myocardial energy metabolism homeostasis in mice

CUI Junjie¹, LAI Ruiyin¹, CHEN Suheng¹, QU Shanshan¹, LIAO Yue¹, MA Xue¹, LI Yulan²

¹First Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; ²Department of Anesthesiology and Surgery, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of overwork on myocardial energy metabolism in mice. **Methods** Thirty-two C57BL/6J mice were randomized equally into a control group and 3 overwork groups with overwork for 2, 4, and 6 weeks (W2, W4, and W6 groups, respectively). The mice in overwork groups were subjected to daily forced water standing and restraint. The changes in body weight and general condition of the mice were observed weekly. After successful modeling, the mice were examined for changes in echocardiography, blood glucose/lipid profiles, myocardial pathologies, myocardial TG and ATP levels, and expressions in CD36, GLUT1, CPT1B, PPAR α , PFKM, and PKM2 using immunohistochemistry, RT-qPCR or Western blotting. **Results** The mice with prolonged overwork exhibited reduced activity with hair loss, dull fur, and slowed body weight gain without significant changes in cardiac index or function. Blood glucose levels increased significantly in W2 and W4 groups but decreased in W6 group. Serum TG level increased significantly while TC, HDL, and LDL decreased in W4 and W6 groups. HE staining revealed myocardial swelling, disorganization, and vacuolation in the mouse models. Myocardial TG was elevated in W4 and W6 groups and ATP level decreased in W6 group. The mRNA and protein expressions of CPT1B and PPAR α were downregulated in W4 and W6 group, and CD36 expression increased significantly in W4 group. GLUT1 and PFKM/PKM2 expressions decreased obviously in W2 group but increased in W4 and W6 group compared with that in W2 group. **Conclusion** Short-term overwork causes elevation of blood glucose and suppresses glycolysis in mice, while prolonged overwork reduces glucose, increases TG, impairs fatty acid oxidation, and limits glycolytic compensation to eventually result in myocardial damage, lipid accumulation, and ATP deficiency.

Keywords: overwork; myocardium; energy metabolism; fatty acid oxidation; glycolysis

在全球经济快速发展的背景下, 各行业劳动者工作时间不断延长。研究表明长时间过度疲劳会引起心脏病、卒中、高血压和抑郁症的风险增加^[1]。世界卫生组织2021年提出: 全球约有4.8亿人存在长时间工作的状况

(≥ 55 h/周), 其中约有4.9%的人死于缺血性心脏病^[2]。过劳死的主要原因是工作量过大导致的脑血管或缺血性心脏病, 或工作中的严重压力而导致的精神障碍^[3]。尽管流行病学已证实过劳与心血管疾病风险关系密切, 但过劳引起心血管疾病或猝死的具体机制尚不清楚, 目前已知的原因可能是心血管并发症、代谢紊乱、免疫系统抑制等^[4]。

心脏作为高耗能、低储能器官, 主要燃料是循环中的游离脂肪酸, 其余为葡萄糖和乳酸等, 几乎所有的能

收稿日期: 2025-05-27

基金项目: 国家自然科学基金(82460017)

Supported by National Natural Science Foundation of China (82460017).

作者简介: 崔俊杰, 在读硕士研究生, E-mail: cuijj2023@lzu.edu.cn

通信作者: 李玉兰, 教授, 博士生导师, E-mail: liyul@lzu.edu.cn

量(>95%)均来自线粒体氧化磷酸化,其余部分来自糖酵解^[5]。在禁食、运动或疾病状态下通常伴随底物供应和血流动力学改变,为保证ATP的生成与消耗相匹配,心肌自身会灵活改变其底物偏好。研究观察到心肌病和心力衰竭患者中,心脏通常更偏向于利用葡萄糖而不是脂肪酸,然而此时并无伴随脂肪酸摄取减少,心肌甘油三酯的堆积可能导致疾病进展^[6]。肥胖和糖尿病小鼠心脏几乎完全依赖脂肪酸氧化来产生ATP,长期胰岛素抵抗会导致其最终丧失底物代谢的灵活性,进而发生心功能不全^[7]。尽管蛋白质组学研究提示动物疲劳状态下存在代谢的重编程,提示过劳可能深层次干扰心肌能量代谢稳态,但该研究仅对动物进行短期过劳干预,缺少从能量代谢角度明确过劳对心肌的直接影响^[8]。本研究拟通过构建小鼠过劳模型,系统评估不同时间过劳对心肌脂肪酸氧化、糖酵解变化的影响,探索其可能的分子机制,为识别与过劳相关心源性猝死的早期生物标志物提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和设备

Vevo 3100LT 超高分辨率小动物超声成像系统(FUJIFILM Visual Sonics);全自动生化分析仪(SIEMENS);全封闭组织脱水机(Histocore Pearl);组织包埋机(KD-BM/BL);切片机(Leica RM2245/RM2235);ATP含量化学发光法试剂盒、甘油三酯(TG)比色法试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技公司);实时定量PCR仪(Roche);兔抗[分化簇36(CD36)、肉碱棕榈酰转移酶1B(CPT1B)、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α)、葡萄糖易化扩散转运蛋白1(GLUT1)、磷酸果糖激酶(PFKM)、丙酮酸激酶同工酶2(PKM2)、微管蛋白(Tubulin)];鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(一抗);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(二抗)(武汉博士德生物技术有限公司);曝光仪(易亨特)。

1.2 实验动物与分组

SPF级雄性C57BL/6J小鼠32只,6~8周龄,体质量18~22 g,由兰州大学实验动物中心提供。采用随机数字表法将32只小鼠分为4组:对照组、过劳2周(W2)组、过劳4周(W4)组、过劳6周(W6)组,8只/组。实验前小鼠适应性喂养1周,饲养环境为室温(24 \pm 1) $^{\circ}$ C、湿度(45 \pm 10)%,明暗交替12 h,喂食标准饲料,自由饮水。本研究经兰州大学第一医院伦理委员会批准(伦理批号:LDYYLL2025-19)。

1.3 模型建立

每天10:00将W2、W4和W6组小鼠放入水深为0.8 \pm 0.2 cm、水温为(23 \pm 1) $^{\circ}$ C的水盆,18:00将其拿出擦干,再装进束缚筒中,21:00结束后放回笼中。W2、W4

和W6分别连续造模2周、4周和6周,对照组正常饲养,不做特殊处理,造模后每周测量小鼠的体质量并观察状态。

1.4 超声心动图检测

小鼠分别过劳2周、4周和6周后,应用Vevo 3100LT高分辨小动物超声仪器选取胸骨旁左心室长轴图像。使用2%异氟烷麻醉小鼠,进行M型超声测量,从左胸骨旁乳头肌水平切面记录并测量心功能指标:左室收缩末内径(LVIDs)、左室舒张末内径(LVIDd)、左室后壁舒张末厚度(LVPWd)、射血分数(EF)、左室短轴缩短率(FS)等。

1.5 标本获取与处理

造模结束后,小鼠进行1.25%三溴乙醇腹腔注射(0.1 mL/10 g)麻醉后摘眼球取血至肝素抗凝管中。过量麻醉小鼠安乐死,剪开腹腔,分离其心脏,PBS缓冲液清洗,滤纸吸干,称取心脏质量后,冰上迅速解剖取其心室肌组织,4 $^{\circ}$ C PBS缓冲液冲洗,部分心室组织置于多聚甲醛溶液,其余组织剪成小块置于-80 $^{\circ}$ C保存备用。

1.6 血浆生化检测

取血0.2 mL置于肝素抗凝管,使用全自动生化分析仪检测血清葡萄糖(GLU)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL)含量。

1.7 HE染色

将固定于4%多聚甲醛中心肌组织使用梯度乙醇(80%、90%、95%)逐级脱水,使用二甲苯进行透明、浸蜡、常规石蜡包埋保留形态,手动轮转式切片机制成4 μ m厚度的病理切片,将切片放入二甲苯中脱去石蜡,梯度乙醇脱水(95%、85%、70%),用Harris苏木精液染核,1%盐酸酒精分化;1%伊红染色使胞质着色。再次乙醇脱水,二甲苯进行透明,封片,采用病理切片扫描机进行扫描,观察心肌病理学形态变化并拍照。

1.8 心肌TG测定

取心肌组织10 mg,按1:9的比例加入无水乙醇90 μ L并匀浆,使组织完全裂解,裂解后以4 $^{\circ}$ C,10 000 r/min离心10 min。吸取上清置于冰上,加入试剂后在酶标仪上测定 $A_{510\text{ nm}}$ 值,计算组织TG浓度。

1.9 心肌组织ATP测定

取心肌组织15 mg,按1:9的比例加入135 μ L裂解液制成匀浆,使组织完全裂解,裂解后在4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min离心10 min。吸取上清,100 $^{\circ}$ C水浴下煮沸2 min,随后用流水冷却,置于冰上,使用黑色96孔板,在样品检测孔中加入100 μ L的ATP检测工作液,100 μ L酶工作液,随后在样品检测孔中加入20 μ L样品混匀,使用化学发光法测定RLU值并绘制标准曲线,最后计算组织的

ATP浓度。

1.10 心肌组织RNA提取及RT-qPCR检测

称取30 mg心室肌组织,加入1 mL的TRizol,置于冰上30 min,加入氯仿,剧烈摇晃后静置15 min,随后4 °C, 12 000 r/min离心15 min,吸取上清,加入异丙醇,静置,离心,随后加入75%无水乙醇,离心,倒掉上清,晾干后,加入无酶水,再次离心,NanoDrop检测RNA的浓度及纯度,反转录合成模板链cDNA,取10 μL反转录产物检测PCR,以β-actin内参基因,2^{-ΔΔCt}法计算目的基因相对表达量。实验重复3次。PCR引物序列(引物由擎科生物科技公司合成)(表1)。

表1 PCR引物序列

Tab.1 Primer sequence for RT-qPCR

Gene	Sequence of primers
CPT1B	F: GCACACCAGGCAGTAGCTTT
	R: CAGGAGTTGATTCCAGACAGGTA
PPARα	F: AGAGCCCCATCTGTCCTCTC
	R: ACTGGTAGTCTGCAAAAACAAA
PFKM	F: TGTGGTCCGAGTTGGTATCTT
	R: GCACTTCCAATCACTGTGCC
PKM2	F: GCCGCCTGGACATTGACTC
	R: CCATGAGAGAAATTCAGCCGAG
ACTB	F: GGCTGTATTCCCCTCCATCG
	R: CCAGTTGGTAACAATGCCATGT

F: Forward primer; R: Reverse primer.

1.11 心肌组织免疫组化检测

心肌组织蜡块切片,60 °C烤片2 h后,置于二甲苯中浸泡脱蜡,梯度无水乙醇水化,进行抗原修复,5%BSA血清封闭,加入一抗CD36(1:200)、GLUT1(1:200)在37 °C孵育1 h,加入二抗(1:300)后室温孵育1 h,DAB显色,滴加苏木素复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,最后使用中性树脂封片,显微镜拍照选取多个视野并使用ImageJ进行分析。

1.12 心肌组织蛋白的提取及Western blotting检测

1.12.1 心肌组织蛋白的提取及定量 剪取心室肌组织标本,PBS冲洗后,吸干水分,按每30 mg心肌组织加入300 μL的RIPA组织裂解液和3 μL PMSF(蛋白酶和磷酸酶抑制剂),充分研磨并超声裂解使其混合均匀。4 °C, 13 000 r/min离心15 min,吸取上清液即蛋白提取液,转入1.5 mL新的EP管内,并用BCA法绘制标准曲线,测定心肌组织蛋白含量。

1.12.2 Western blotting检测 配置分离胶盒浓缩胶,将样品加入Loading buffer变性。使用80 V、30 min,120 V、1 h进行电泳,将PVDF膜在甲醇中激活后,转膜35 min,使用5%脱脂牛奶封闭2 h,分别加入兔抗CPT1B(1:1000)、PPARα(1:1500)、PFKM(1:2000)、PKM2(1:1000)、Tubulin(1:2000)和鼠抗GAPDH(1:10 000),4 °C孵育过夜,第2天使用TBST洗膜3次,10 min/次。随后加入二抗(1:7500),室温摇床下孵育1 h,洗膜后将化学发光液均匀滴于PVDF膜,显影机下曝光并半定量分析。

1.13 统计学分析

采用SPSS 27.0软件进行统计分析,GraphPad Prism 9.0软件制图。计量数据用均数±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析。实验独立重复3次。 $P<0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 过劳对小鼠一般状态和体质量的影响

实验期间无小鼠死亡。对照组小鼠无异常表现,但随着过劳时间的延长,W2组、W4组和W6组小鼠主要表现为活动减少、反应迟缓。尤其是在W4和W6组中,部分小鼠皮毛晦暗、并且毛发脱落持续加重。

对照组小鼠自第2周体质量增加($P<0.001$),造模组小鼠体质量缓慢增长,每周之间的体质量差异无统计学意义($P>0.05$)。W2、W4和W6组小鼠第0天和第1周体质量与对照组比较无统计学意义($P>0.05$),而第2、3、4、5、6周体质量降低(表2)。

表2 各组小鼠体质量随造模时间变化情况

Tab.2 Changes of body weight of the mice in each group during modeling (g, Mean±SD, n=8)

Group	Modeling time (weeks)						
	0	1	2	3	4	5	6
CON	20.45±0.29	21.13±0.23	22.02±0.31 ^a	22.54±0.47 ^a	23.18±0.47 ^a	23.96±0.37 ^a	24.3±0.38 ^a
W2	20.00±0.37	19.94±0.50	20.13±0.40 ^d				
W4	20.50±0.19	20.24±0.24	20.41±0.19 ^d	20.90±0.24 ^b	21.14±0.30 ^c		
W6	19.89±0.19	20.51±0.20	20.85±0.25 ^c	20.35±0.48 ^c	20.80±0.49 ^d	21.29±0.52 ^d	21.54±0.45 ^d

CON: Control group; W2: overwork for 2 weeks group; W4: overwork for 4 weeks group; W6: overwork for 6 weeks group. (The same group names are consistently used across all the following tables and figures). ^a $P<0.001$ vs day 0 of this group, ^b $P<0.05$, ^c $P<0.01$, ^d $P<0.001$ vs CON group at the same time point.

2.2 过劳对小鼠心脏质量指数(心脏质量/体质量)和心功能的影响

在本实验条件下,过劳并未引起小鼠明显的心功能不全或心脏结构重构。与对照组比较,W2、W4和W6组小鼠心脏质量指数差异无统计学意义($P>0.05$,图1A)。

超声心动图显示,各组间小鼠心功能指标包括左室收缩末内径(LVIDs)、左室舒张末内径(LVIDd)、射血分数(EF)、左室短轴缩短率(FS)及左室后壁舒张末厚度(LVPWd)均无统计学差异($P>0.05$,图1B,表3)。

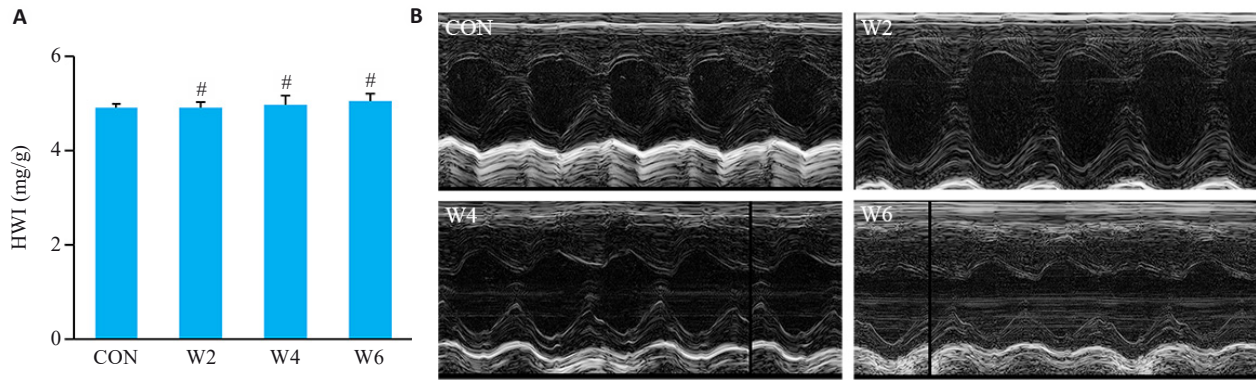


图1 各组心脏质量指数和超声心动图

Fig.1 Heart weight index (A) and echocardiography (B) in each group (mg/g, Mean±SD, n=8). # $P>0.05$ vs CON group. CON: Control group. W2: overwork for 2 weeks group; W4: overwork for 4 weeks group; W6: overwork for 6 weeks group.

表3 各组心功能变化

Tab.3 Cardiac function changes in each group (Mean±SD, n=3)

Group	LVIDs (mm)	LVIDd (mm)	EF%	FS%	LVPWd (mm)
CON	2.06±0.52	3.03±0.02	65.29±0.32	35.01±0.50	0.84±0.03
W2	2.01±0.33	3.06±0.03	65.76±0.44	35.14±0.79	0.84±0.01
W4	2.10±0.09	3.11±0.06	64.99±0.79	36.26±0.21	0.85±0.05
W6	2.11±0.06	3.18±0.01	64.87±0.55	35.28±0.43	0.85±0.01

LVIDs: left ventricular end-systolic diameter; LVIDd: left ventricular end-diastolic diameter; EF: ejection fraction; FS: fractional shortening rate; LVPWd: left ventricular posterior wall end-diastolic thickness.

2.3 血糖和血脂指标变化

血糖水平表现为明显的时相行变化:与对照组比较,W2、W4组血糖水平升高($P<0.01$),其中W2>W4,W6组血糖水平降低($P<0.001$);与W2组比较,W4和W6组血糖降低(均 $P<0.001$);与W4组比较,W6组血糖降低($P<0.001$)。

血脂代谢出现紊乱:与对照组比较,与对照组比较,W4、W6组血清TG增加(均 $P<0.001$),其中W6>W4,与W2组比较,W4和W6组血清TG增加(均 $P<0.01$);与对照组比较,W2、W4和W6组血清TC降低($P<0.01$),其中W2>W6>W4;与对照组比较,W2、W4和W6组血清HDL降低($P<0.01$),但HDL水平在W6组中表现为略有回升,W2>W6>W4;与对照组比较,W4和W6组血清LDL降低($P<0.01$),且W6<W4组,其余组间比较差异无统计学意义(图2)。

2.4 心肌组织病理形态学、心肌TG和ATP浓度的变化

2.4.1 HE染色分析 HE染色结果显示:对照组小鼠心肌细胞排列紧密,细胞核形态正常,W2组内表现为毛细血管充血增加,W4组心肌细胞排列疏松、间质增宽和早

期空泡化改变,W6组心肌则细胞间质疏松明显,细胞核周围空泡化增多,心肌纤维肿胀,排列紊乱(图3A)。

2.4.2 心肌TG浓度 与对照组比较,W4和W6组心肌TG浓度增加(均 $P<0.001$),其中W4组>W6组(图3B)。

2.4.3 心肌ATP浓度 与对照组比较,W2、W4组的小鼠心肌ATP浓度差异无统计学意义($P>0.05$),而W6组小鼠心肌ATP浓度降低($P<0.05$,图3C)。

2.5 过劳对小鼠心肌CD36、CPT-1B、PPAR α 、GLUT1、PFKM、PKM2的影响

2.5.1 CPT-1B、PPAR α 、PFKM、PKM2基因表达水平与对照组比较,W4、W6组小鼠心肌CPT1B、PPAR α mRNA表达降低($P<0.05$),且W4>W6;与W2组比较,W4、W6组心肌CPT1B、PPAR α mRNA表达降低($P<0.05$ 或 $P<0.001$);与对照组比较,W2组心肌PFKM mRNA表达降低($P<0.001$),W4、W6组心肌PFKM mRNA表达增加($P<0.05$),且W4>W6,与W2组比较,W4、W6组心肌PFKM mRNA表达增加($P<0.001$),W4组心肌PKM2 mRNA表达增加($P<0.05$),其余各组差异无统计学意义(图4)。

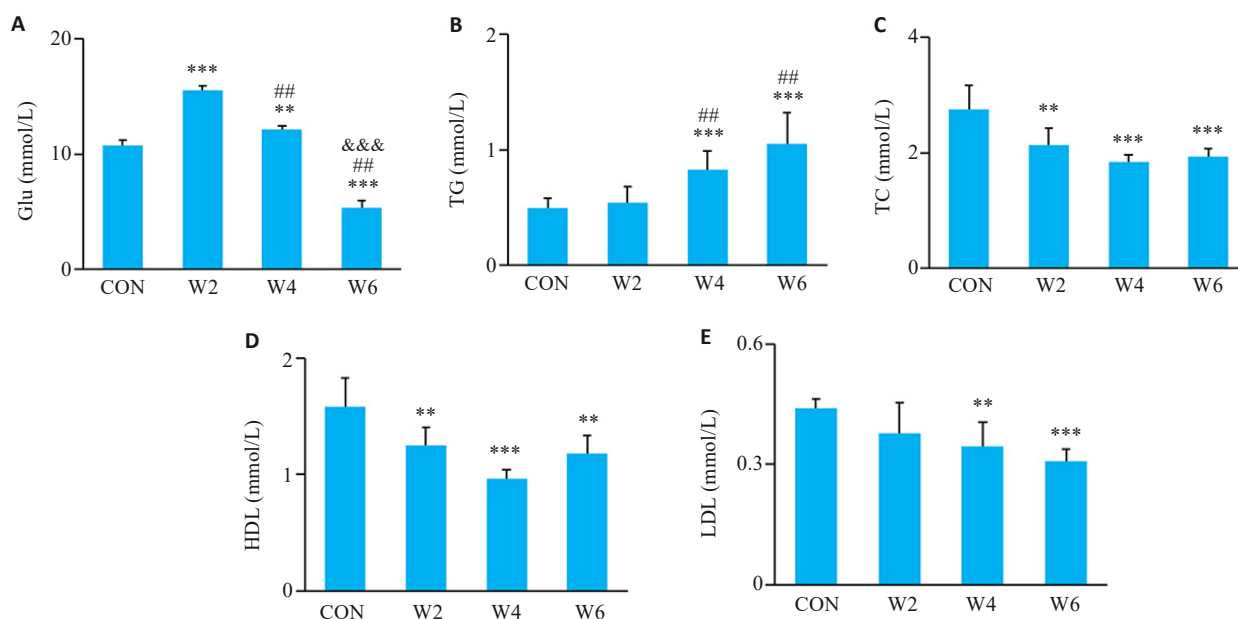


图2 各组血糖和血脂变化

Fig.2 Changes of blood glucose and blood lipids in each group (*Mean±SD, n=6*). A-E: Blood glucose (Glu), triglycerides (TG), cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL) levels, respectively. ***P*<0.01, ****P*<0.001 vs CON group; #*P*<0.01 vs W2 group; &&&*P*<0.001 vs W4 group.

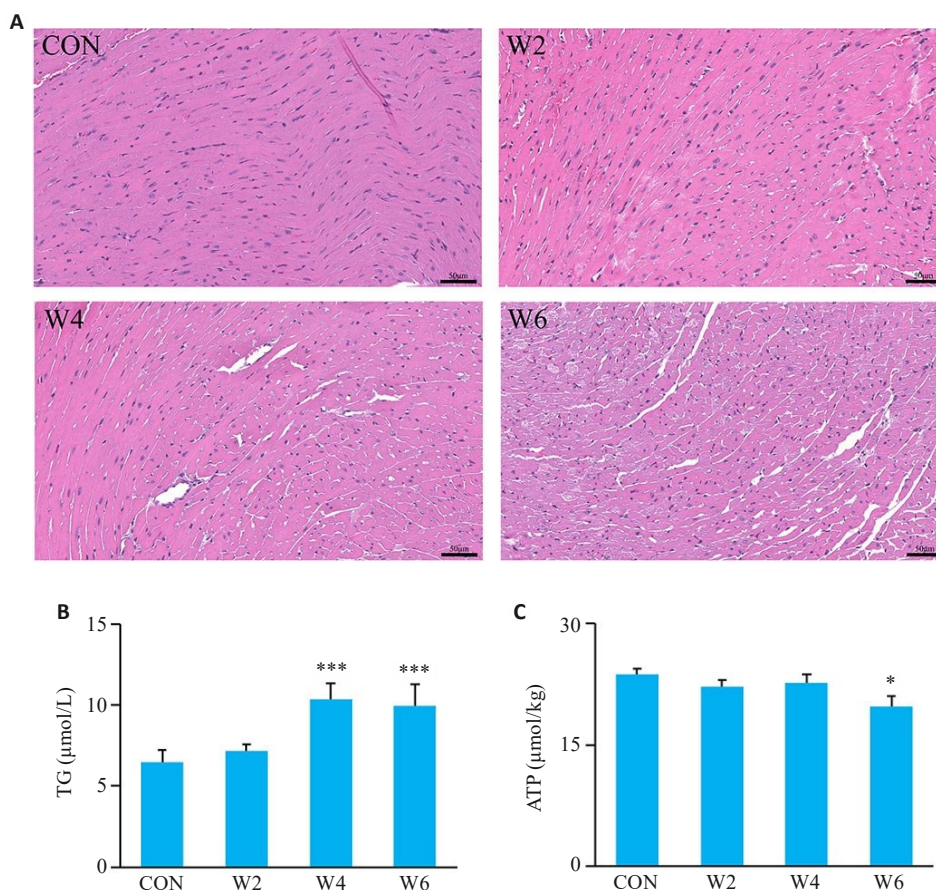


图3 各组小鼠心肌组织病理学,TG和ATP浓度变化

Fig.3 Histopathological changes of the myocardial tissues and changes in myocardial TG and ATP levels in each group. A: HE staining (Scale bar=50 μm). B: Myocardial TG level (*n=6*; ****P*<0.001 vs CON group). C: Myocardial ATP level (*n=6*; **P*<0.05 vs CON group).

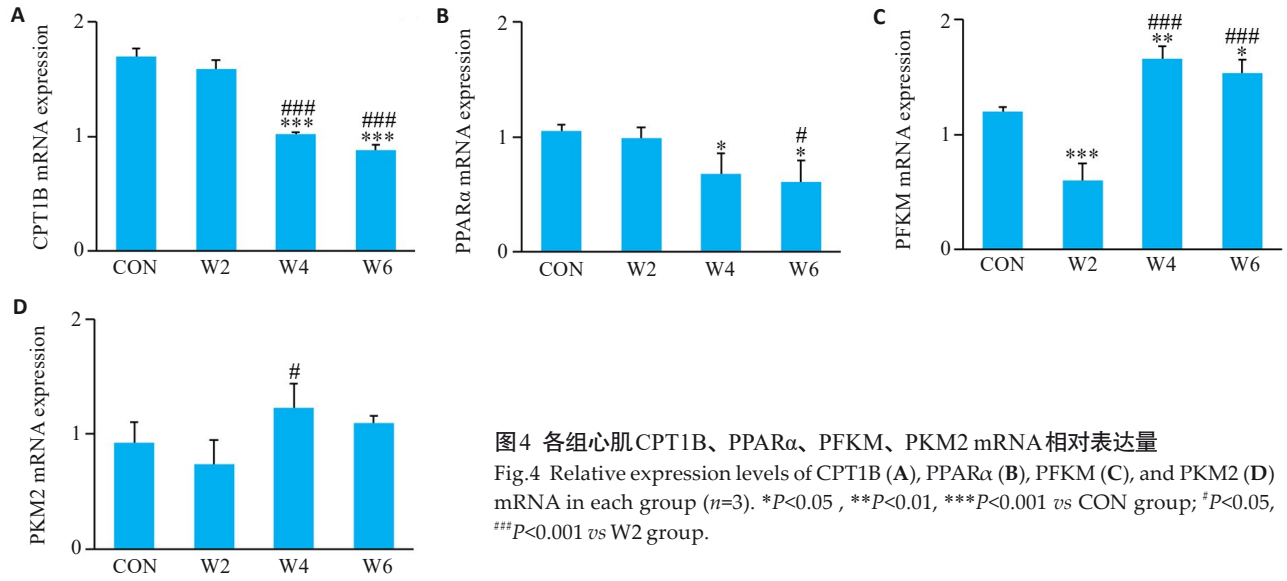


图4 各组心肌CPT1B、PPARα、PFKM、PKM2 mRNA相对表达量
Fig.4 Relative expression levels of CPT1B (A), PPARα (B), PFKM (C), and PKM2 (D) mRNA in each group (n=3). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs CON group; #P<0.05, ###P<0.001 vs W2 group.

2.5.2 免疫组织化学法染色定量分析心肌 CD36、GLUT1 蛋白表达 与对照组比较,W4组心肌CD36蛋白表达升高(P<0.05),而W2和W6组心肌CD36蛋白表达差异无统计学意义(P>0.05),W2组心肌GLUT1蛋

白相较于对照组表达减少(P<0.05),虽W4和W6组表达有所增加,但与其他组间比较差异无统计学意义(P>0.05,图5)。

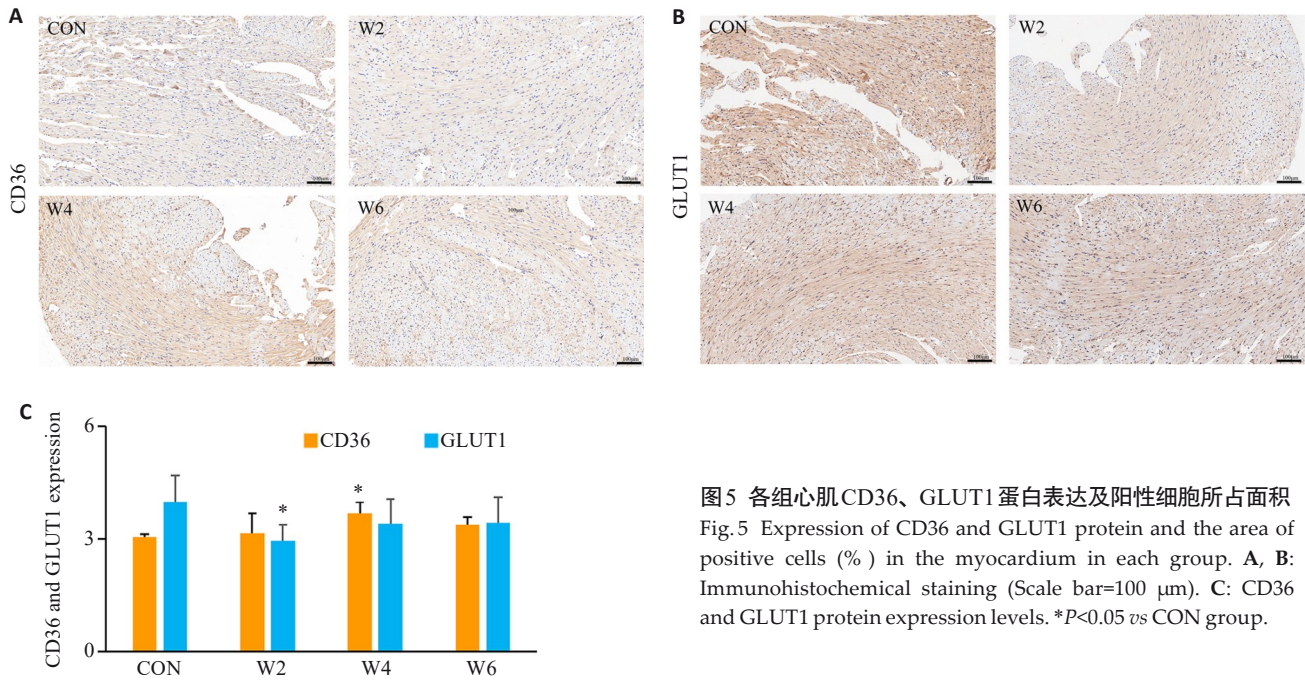


图5 各组心肌CD36、GLUT1蛋白表达及阳性细胞所占面积
Fig.5 Expression of CD36 and GLUT1 protein and the area of positive cells (%) in the myocardium in each group. A, B: Immunohistochemical staining (Scale bar=100 μm). C: CD36 and GLUT1 protein expression levels. *P<0.05 vs CON group.

2.5.3 Western blotting 半定量分析 CPT1B、PPARα、PFKM、PKM2 蛋白质相对表达水平 与对照组比较, W4、W6 组心肌 CPT1B、PPARα 蛋白表达降低(P<0.05),且W6组<W4组,与W2组相比,W4、W6组心肌CPT1B蛋白表达降低(P<0.001),W6组心肌PPARα蛋白表达降低(P<0.01);与对照组相比,W2组心肌PFKM、PKM2蛋白表达降低(P<0.01, P<0.001),且W6组>W4组与W2组相比,W4、W6组心肌PFKM、

PKM2蛋白表达增加(P<0.01或P<0.001,图6)。

3 讨论

越来越多的猝死案例中,过劳成为“隐形杀手”,过劳导致的心源性猝死,其特征不单是明显的器质性病变。近年来,过劳已经成为严重的社会健康问题。长期慢性疲劳在诸多行业中普遍存在^[9],但其在分子及代谢机制变化仍缺乏的实验证据。本实验沿用刘艳艳等^[10]

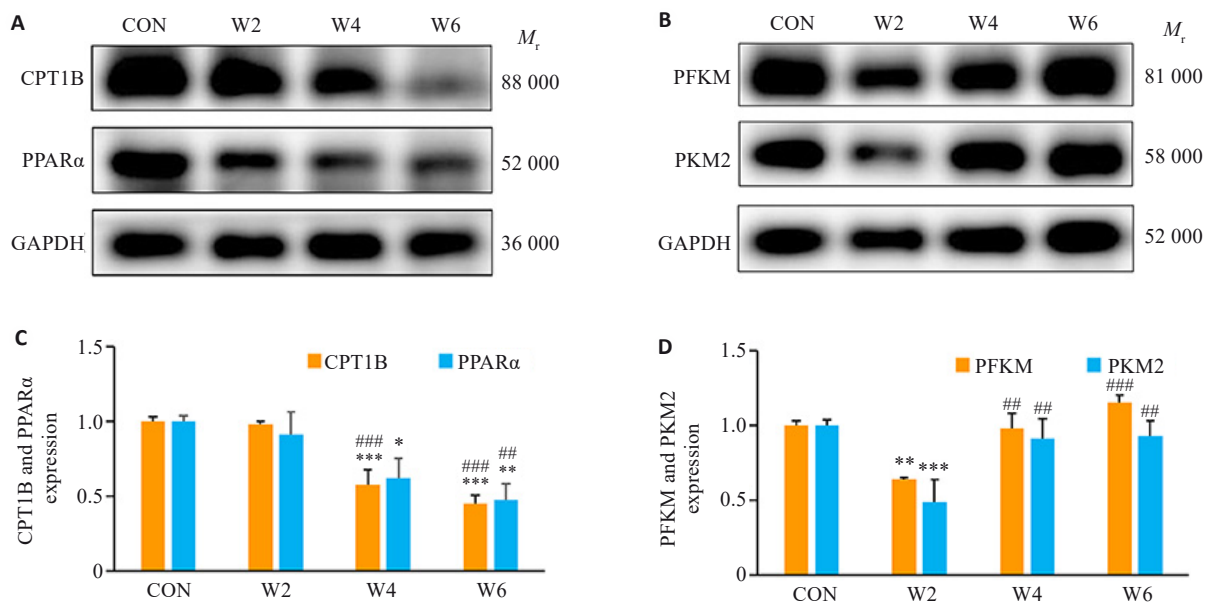


图6 各组心肌CPT1B、PPARα、PFKM、PKM2蛋白相对表达量

Fig. 6 Relative protein expressions of CPT1B, PPARα, PFKM and PKM2 in the myocardium in each group. A, B: Protein bands in Western blotting. C, D: CPT1B, PPARα, PFKM, and PKM2 protein expression levels in each group. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001 vs CON group; #*P*<0.01, ###*P*<0.001 vs W2 group.

小鼠水中站立联合慢性束缚应激模型及课题组前期实验的模型方法^[11],该模型不但避免了强迫游泳实验造成的小鼠呛水和失温,而且利用小鼠厌水习性,干扰小鼠作息,成功模拟人体过劳时躯体和心理双重疲劳的特点。实验发现,随着过劳时间的延长,小鼠出现活跃度降低、毛发脱落、皮毛晦暗,体质量增长停滞等现象,符合慢性疲劳的特点。同时,本次实验未对小鼠限制饮食,但持续过劳小鼠血糖降低^[12],证明动物疲劳模型构建成功。

实验结果显示,小鼠过劳后心脏指数与心功能未见明显改变。在过劳初期,血糖水平急剧上升;但随着过劳时间延长,血糖呈现消耗性下降。血清TG水平在整个过劳期间持续升高,尽管HDL有所升高,但TC、LDL和HDL的总体水平仍普遍降低。心肌组织在过劳初期仅表现为部分毛细血管充血;随着过劳程度加重,逐渐出现心肌细胞结构疏松、排列紊乱及核周空泡化增多。此外,持续过劳导致心肌中TG不断沉积,ATP水平也逐渐降低。在分子水平上,过劳后小鼠心肌脂肪酸氧化的关键酶CPT1B及脂代谢调控因子PPARα的mRNA和蛋白表达持续下调;相反,脂肪酸转运蛋白CD36的表达在特定阶段有所增加。另一方面,参与葡萄糖转运的GLUT1蛋白以及糖酵解关键酶PFKM和PKM2的mRNA和蛋白表达在过劳初期受到抑制,但实验末期却出现回升。

血糖在过劳初期升高,这可能是因交感神经活跃时肌肉和肝脏中的糖原被迅速分解以满足机体对能量需求的表现,在疲劳应激时皮质醇和促肾上腺皮质激素分

泌增加,是哺乳动物主要应激反应机制^[13,14]。尽管本实验未限制小鼠饮食,但我们观察到持续疲劳状态下血糖消耗加速,符合小鼠力竭游泳模型中血糖变化^[15]。人体在长时间的耐力运动后,血糖浓度亦会降低^[16],提示持续过劳可能与糖原储备耗竭有关。

血清TG升高可能与肝脏代谢障碍或炎症相关,近期一项模拟慢性应激的研究中,小鼠在持续四周的强迫游泳后表现为血清TG的浓度增加^[17],类似的当小鼠进行八周的间歇跑步后,血清TC和LDL降低,这些现象与我们的研究结果一致^[18]。廖阅等^[19]研究表明:长时间疲劳会引起慢性应激和炎症因子上调,提示过劳造成机体持续性炎症。现有研究已证实机体在慢性压力下常伴随肝功能受损^[20],表明持续的躯体疲劳可以促进循环中TC和LDL的消耗却同时造成TG蓄积。TG与动脉粥样硬化的之间的关系已被多次研究证实^[21,22],2011年美国心脏协会已确定TG是心血管疾病风险的重要生物标志物^[23]。同时,课题组前期研究揭示过劳对血管存在损伤,提示过劳损害动脉血管的同时,TG的积累加速了向动脉粥样硬化的发展^[24]。尽管HDL水平上升可能反映机体在过劳下的某种代偿反应,但在脂代谢紊乱背景下,HDL可能存在功能异常,并不一定发挥心血管保护作用^[25]。

本实验中过劳未损害小鼠心功能,但过度运动对心肌的潜在损害已被多项研究证实:其机制包括氧化应激、钙清除受损、线粒体呼吸受损等^[26,27]。小鼠心肌HE染色显示持续过劳可引起心肌纤维肿胀、排列紊乱并疏松空泡化,提示长期过劳损伤心肌微结构,并随着过劳

时间延长而加重^[28]。本实验中持续过劳造成CPT1B、PPAR α 表达减少,CPT1作为脂肪酸氧化关键酶,控制线粒体对长链酰基辅酶A的摄取,介导其穿越线粒体完成 β 氧化,CPT1B的抑制程度与可能与心肌病的严重程度相关^[29]。He等^[30]发现在CPT1B缺失的条件下,约有80%的小鼠在主动脉弓缩窄术后的压力负荷下表现出心肌细胞凋亡、充血性心力衰竭而过早死亡。同时,脂肪酸氧化在很大程度上受到过氧化物酶体增殖物激活受体(PPARs)的调节,PPAR α 是脂肪酸代谢的主要转录调节因子,其编码基因包括脂肪酸摄取、酯化和线粒体摄取,在大鼠运动疲劳模型中也证实心肌PPAR α 会根据心肌微损伤程度而表达降低^[31]。然而CD36的表达却出现增加,表明持续过劳造成心肌脂肪酸氧化受损和能量供应不足,但增强了心肌脂肪酸摄取,这可能是心脏中TG持续堆积的主要途径。由于心肌细胞内脂质储存能力有限,持续的脂质积累可能会转化为甘油二酯和神经酰胺等,导致脂毒性心肌病的发生和发展,最终影响心肌结构、功能和电生理学^[32,33]。在病案报道中3名过劳猝死患者的尸检报告中也提示均合并心肌脂肪样变^[9]。因此,我们推测心肌脂肪酸氧化受损和脂质堆积可能是造成类似过劳相关心源性猝死的重要原因之一。

过劳初期高血糖的情况下, GLUT1、PFKM和PKM2等糖代谢关键酶表达却受到抑制,表明心肌对葡萄糖的摄取与利用并未随着外周底物的高水平而增加,同样人体在高强度运动中心肌对葡萄糖利用减少,这可能与运动状态下乳酸和游离脂肪酸浓度增加而抑制体内葡萄糖的利用有关^[34],也有研究认为运动介导的血糖增加并未促进心脏的葡萄糖摄取^[35]。这可能与此时脂肪酸氧化或其他物质的供能仍维持劳力所需有关。糖类在正常心肌中仅占ATP生成的25%~30%,但有学者的转录组学表明:心肌脂肪酸氧化受损时常需要增加葡萄糖和乳酸的利用尤其是糖酵解比重,用来保证正常的心脏能耗^[36]。随着过劳持续,虽糖酵解关键酶表达呈现部分回升,并且这种心肌糖酵解的短暂抑制和适应后增加主要被认为是PFK的激活^[37],但持续的TG沉积和心肌脂肪酸氧化不足,已造成ATP产生减少,表明这种糖酵解激活尚不足以补充脂肪酸氧化不足造成的能量匮乏,进而增加了过劳状态下的心肌易损性。

本研究存在一定局限性。能量代谢调节网络复杂多样,糖代谢与脂代谢之间的交互作用可能在一定程度上掩盖了通路中的精细调控机制。未来研究可整合代谢组学分析与同位素标记示踪技术,进一步明确能量底物的动态代谢过程,以期对心血管疾病的防治提供新的策略和靶点。

综上所述,长时间过劳会增加循环中TG蓄积和葡萄糖消耗,影响心肌能量代谢的稳态,造成心肌脂肪酸

氧化受损和心肌供能不足甚至心肌细胞损伤,这可能是过劳引起相关恶性心律失常和心源性猝死的原因之一。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] Kivimäki M, Jokela M, Nyberg ST, et al. Long working hours and risk of coronary heart disease and stroke: a systematic review and meta-analysis of published and unpublished data for 603, 838 individuals [J]. *Lancet*, 2015, 386(10005): 1739-46.
- [2] Pega F, Náfrádi B, Momen NC, et al. Global, regional, and national burdens of ischemic heart disease and stroke attributable to exposure to long working hours for 194 countries, 2000-2016: a systematic analysis from the WHO/ILO Joint Estimates of the Work-related Burden of Disease and Injury [J]. *Environ Int*, 2021, 154: 106595.
- [3] Eguchi H, Wada K, Smith DR. Recognition, compensation, and prevention of karoshi, or death due to overwork [J]. *J Occup Environ Med*, 2016, 58(8): e313-4.
- [4] Al-Madhagi HA. Unveiling the global surge: unraveling the factors fueling the spread of karoshi syndrome [J]. *Risk Manag Healthc Policy*, 2023, 16: 2779-82.
- [5] Lopaschuk GD, Karwi QG, Tian R, et al. Cardiac energy metabolism in heart failure [J]. *Circ Res*, 2021, 128(10): 1487-513.
- [6] Flam E, Jang C, Murashige D, et al. Integrated landscape of cardiac metabolism in end-stage human nonischemic dilated cardiomyopathy [J]. *Nat Cardiovasc Res*, 2022, 1(9): 817-29.
- [7] Piché ME, Tchernof A, Després JP. Obesity phenotypes, diabetes, and cardiovascular diseases [J]. *Circ Res*, 2020, 126(11): 1477-500.
- [8] 李嘉敏, 苏锐冰, 于晓军, 等. 大鼠过劳死模型的建立及基于模型的能量代谢和氧化应激的蛋白质组学和代谢组学分析 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2024, 51(8): 1935-49.
- [9] Miao Q, Li J, Pan YP, et al. Three cases of karoshi without the typical pathomorphological features of cardiovascular/cerebrovascular disease [J]. *Am J Forensic Med Pathol*, 2020, 41(4): 305-8.
- [10] 刘艳艳, 程静茹, 余克强, 等. 疲劳型亚健康小鼠模型的研制 [J]. *广东医学*, 2012, 33(1): 21-4.
- [11] 邓三春, 陈苏衡, 于恺华, 等. 过度劳累对小鼠脾脏造血功能的影响 [J]. *陆军军医大学学报*, 2024(5): 427-33.
- [12] Matsui T, Ishikawa T, Ito H, et al. Brain glycogen supercompensation following exhaustive exercise [J]. *J Physiol*, 2012, 590(3): 607-16.
- [13] Lee WD, Liang LF, AbuSalim J, et al. Impact of acute stress on murine metabolomics and metabolic flux [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120(21): e2301215120.
- [14] Lightman SL, Birnie MT, Conway-Campbell BL. Dynamics of ACTH and Cortisol secretion and implications for disease [J]. *Endocr Rev*, 2020, 41(3): bnaa002.
- [15] Chen YY, Gao TH, Bai J, et al. Ren-Shen-Bu-Qi decoction alleviates exercise fatigue through activating PI3K/AKT/Nrf2 pathway in mice [J]. *Chin Med*, 2024, 19(1): 154.
- [16] Flockhart M, Tischer D, Nilsson LC, et al. Reduced glucose tolerance and insulin sensitivity after prolonged exercise in endurance athletes [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2023, 238(4): e13972.
- [17] Zhang QL, Shen XT, Yuan X, et al. Lipopolysaccharide binding

- protein resists hepatic oxidative stress by regulating lipid droplet homeostasis[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 3213.
- [18] Geng J, Zhang XL, Guo YJ, et al. Moderate-intensity interval exercise exacerbates cardiac lipotoxicity in high-fat, high-calories diet-fed mice[J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 613.
- [19] 廖 阅, 马 雪, 邓三春, 等. 过劳诱导小鼠血管内皮屏障功能障碍[J]. *南方医科大学学报*, 2024, 44(9): 1814-20.
- [20] Kim HG, Lee JS, Lee JS, et al. Hepatoprotective and antioxidant effects of Myelophil on restraint stress-induced liver injury in BALB/c mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 142(1): 113-20.
- [21] Raposeiras-Roubin S, Rosselló X, Oliva B, et al. Triglycerides and residual atherosclerotic risk[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2021, 77(24): 3031-41.
- [22] Nordestgaard BG. Triglyceride-rich lipoproteins and atherosclerotic cardiovascular disease: new insights from epidemiology, genetics, and biology[J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 547-63.
- [23] Miller M, Stone NJ, Ballantyne C, et al. Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2011, 123(20): 2292-333.
- [24] 陈苏衡, 甘露, 庄 苗, 等. 过度劳累对大鼠动脉血管壁细胞外基质的影响[J]. *中国医学科学院学报*, 2022, 44(2): 262-9.
- [25] Zhang YF, Yu MY, Chen Y, et al. High-density lipoprotein in cardiovascular diseases: From high quantity to high quality[J]. *Clin Chim Acta*, 2026, 578: 120574.
- [26] Ljones K, Ness HO, Solvang-Garten K, et al. Acute exhaustive aerobic exercise training impair cardiomyocyte function and calcium handling in Sprague-Dawley rats[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173449.
- [27] Oláh A, Németh BT, Mátyás C, et al. Cardiac effects of acute exhaustive exercise in a rat model[J]. *Int J Cardiol*, 2015, 182: 258-66.
- [28] 马 雪, 廖阅, 邓三春, 等. 过劳不同时间对小鼠心肌细胞焦亡的影响[J]. *解放军医学杂志*, 2025, 50(6): 756-761.
- [29] Haynie KR, Vandanmagsar B, Wicks SE, et al. Inhibition of carnitine palmitoyltransferase1b induces cardiac hypertrophy and mortality in mice[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2014, 16(8): 757-60.
- [30] He L, Kim T, Long QQ, et al. Carnitine palmitoyltransferase-1b deficiency aggravates pressure overload-induced cardiac hypertrophy caused by lipotoxicity[J]. *Circulation*, 2012, 126(14): 1705-16.
- [31] 高瑞芳, 常 芸, 刘云清, 等. 力竭运动后大鼠心肌组织结构改变及不同时相 PPAR α 表达的变化[J]. *中国运动医学杂志*, 2009, 28(3): 264-8.
- [32] O'Connell RP, Musa H, Gomez MSM, et al. Free fatty acid effects on the atrial myocardium: membrane ionic currents are remodeled by the disruption of T-tubular architecture[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0133052.
- [33] Schulze PC, Drosatos K, Goldberg IJ. Lipid use and misuse by the heart[J]. *Circ Res*, 2016, 118(11): 1736-51.
- [34] Gibb AA, Hill BG. Metabolic coordination of physiological and pathological cardiac remodeling[J]. *Circ Res*, 2018, 123(1): 107-28.
- [35] Kempainen J, Fujimoto T, Kalliokoski KK, et al. Myocardial and skeletal muscle glucose uptake during exercise in humans[J]. *J Physiol*, 2002, 542(Pt 2): 403-12.
- [36] Wang X, Zhu XX, Jiao SY, et al. Cardiomyocyte peroxisome proliferator-activated receptor α is essential for energy metabolism and extracellular matrix homeostasis during pressure overload-induced cardiac remodeling[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(5): 1231-42.
- [37] Gibb AA, Epstein PN, Uchida S, et al. Exercise-induced changes in glucose metabolism promote physiological cardiac growth[J]. *Circulation*, 2017, 136(22): 2144-57.

(编辑: 经 媛)