DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20250187

·论　著·

昼夜节律紊乱损害大鼠运动耐力：骨骼肌生物钟失调的介导作用

高　扬[1,2]，程凤佳[2]，杨婷婷[2]，苏香楠[2]，刘雅轩[2]，孔祥浩[2]，于　亮[2,3*]
1. 中国人民解放军海军青岛特勤疗养中心，青岛 266000
2. 北京体育大学运动人体科学学院，北京 100084
3. 体能训练关键核心技术集成系统与器械教育部工程研究中心，北京 100084

［摘要］ **目的**　探讨 12 周昼夜节律紊乱（CRD）对大鼠骨骼肌生物钟及运动耐力的影响。**方法**　将 16 只 8 周龄健康雄性 SD 大鼠随机分为空白对照（BC）组和 CRD 组，各 8 只。其中，BC 组置于 12 h 光照 /12 h 黑暗周期环境中，CRD 组置于 8 h 光照 /16 h 黑暗周期环境中，每周开灯时间延迟 4 h。干预 12 周后，测定大鼠骨骼肌重量、运动耐力、四肢抓力及血压、心率；在透射电镜下观察骨骼肌肌纤维横截面积、骨骼肌超微结构和线粒体形态；采用 ELISA 法检测血清中褪黑素的 24 h 动态节律变化，生化检测试剂盒测定比目鱼肌中 ATP、总烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADP）、氧化型 NADP（$NADP^+$）、还原型 NADP（NADPH）含量及线粒体柠檬酸合酶活性，蛋白质印迹法检测下丘脑及比目鱼肌核心生物钟蛋白、骨骼肌线粒体中呼吸链复合物相关蛋白及过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1α（PGC-1α）的表达水平。**结果**　两组大鼠体重均随干预时间延长呈现增加趋势，且干预第 7～12 周 CRD 组大鼠体重均高于 BC 组（均 $P<0.05$）；干预 12 周后，CRD 组大鼠心率、收缩压、舒张压以及平均动脉压均高于 BC 组（均 $P<0.01$），而大鼠跑动时间和四肢抓力均低于 BC 组（均 $P<0.01$），全身骨骼肌重量、比目鱼肌湿重、趾长伸肌湿重、腓肠肌湿重、胫骨前肌湿重和比目鱼肌肌纤维横截面积均低于 BC 组（均 $P<0.05$）。干预 12 周后，CRD 组比目鱼肌线粒体数目明显减少，膜结构和嵴结构不清晰，Z 线模糊、部分断裂甚至消失，出现巨型线粒体，肌丝排列紊乱。干预 12 周后，CRD 组比目鱼肌中 ATP 含量、总 NADP 含量、NADPH 含量、$NADP^+$含量、$NADP^+$/NADPH 比值及线粒体柠檬酸合酶活性均低于 BC 组（均 $P<0.01$）；与 BC 组相比，CRD 组大鼠 24 h 内褪黑素水平下调，下丘脑和比目鱼肌中核心生物钟蛋白脑和肌肉芳香烃受体核转运样蛋白 1、昼夜节律运动输出周期蛋白、周期蛋白 1 和隐花色素昼夜节律调节因子 1 蛋白表达水平均下降（均 $P<0.01$），比目鱼肌肌线粒体呼吸链复合物蛋白以及线粒体中 PGC-1α 的表达水平均下降（均 $P<0.05$）。**结论**　12 周 CRD 可破坏大鼠血清褪黑素 24 h 分泌节律，下调中枢与骨骼肌核心生物钟蛋白表达，抑制骨骼肌线粒体生物合成与呼吸链功能，最终造成骨骼肌质量丢失、大鼠抓力与运动耐力显著下降。

［关键词］ 昼夜节律紊乱；骨骼肌生物钟；运动耐力；线粒体；呼吸链
［引用本文］ 高扬，程凤佳，杨婷婷，等 . 昼夜节律紊乱损害大鼠运动耐力：骨骼肌生物钟失调的介导作用［J］. 海军军医大学学报，2026，47（10）：1286-1295. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20250187.

Circadian rhythm disruption impairs exercise endurance in rats: the mediating role of skeletal muscle biological clock dysfunction

GAO Yang[1,2], CHENG Fengjia[2], YANG Tingting[2], SU Xiangnan[2], LIU Yaxuan[2], KONG Xianghao[2], YU Liang[2,3*]
1. Qingdao Special Servicemen Recuperation Center of PLA Navy, Qingdao 266000, Shandong, China
2. Sport Science School, Beijing Sport University, Beijing 100084, China
3. Engineering Research Center of Strength and Conditioning Training Key Core Technology Integrated System and Equipment, Ministry of Education, Beijing 100084, China

［**Abstract**］ **Objective**　To investigate the effects of 12-week circadian rhythm disruption (CRD) on the skeletal muscle circadian clock and exercise endurance in rats. **Methods**　Sixteen healthy male Sprague-Dawley (SD) rats aged 8 weeks were randomly assigned to blank control (BC) group or CRD group, with 8 rats in each group. The BC group was housed in a 12 h light/12 h dark cycle environment, while the CRD group was housed in an 8 h light/16 h dark cycle environment, with the light-on time delayed by 4 h each week. After 12 weeks of intervention, skeletal muscle weight,

［收稿日期］ 2025-03-26　［接受日期］ 2025-09-01
［基金项目］ 中央高校基本科研业务费（2025KYPT09，2024GCZX002，2024GCZX005，PD-GCZX002）. Supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2025KYPT09, 2024GCZX002, 2024GCZX005, PD-GCZX002).
［作者简介］ 高　扬，博士，主管技师. E-mail: 593207716@qq.com
*通信作者（Corresponding author）. E-mail: yuliang.ek@163.com

exercise endurance, limb grip strength, blood pressure, and heart rate were measured. The cross-sectional area of skeletal muscle fibers was measured, and skeletal muscle ultrastructure and mitochondrial morphology were observed by transmission electron microscopy. The dynamic circadian rhythm changes of serum melatonin over 24 h were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The contents of adenosine triphosphate (ATP), total nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP), oxidized NADP ($NADP^+$), reduced NADP (NADPH), and mitochondrial citrate synthase activity in the soleus muscle were determined using biochemical assay kits. Western blotting was applied to detect the expression levels of core circadian clock proteins in the hypothalamus and soleus muscle, respiratory chain complex proteins in skeletal muscle mitochondria, and peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1α (PGC-1α). **Results** Body weight in both groups showed an increasing trend over the intervention period, and from weeks 7 to 12, body weight in the CRD group was significantly higher than that in the BC group (all $P<0.05$). After 12 weeks of intervention, heart rate, systolic blood pressure, diastolic blood pressure, and mean arterial pressure in the CRD group were all significantly higher than those in the BC group (all $P<0.01$), whereas running time and limb grip strength were significantly lower than those in the BC group (both $P<0.01$), and whole-body skeletal muscle weight, soleus muscle wet weight, extensor digitorum longus muscle wet weight, gastrocnemius muscle wet weight, tibialis anterior muscle wet weight, and the cross-sectional area of soleus muscle fibers were also significantly lower than those in the BC group (all $P<0.05$). After 12 weeks of intervention, the CRD group showed a significant reduction in the number of soleus muscle mitochondria, with unclear membrane and cristae structures, blurred, partially broken or even disappearing Z-lines, giant mitochondria, and disordered myofilament arrangement. After 12 weeks of intervention, the ATP content, total NADP content, NADPH content, $NADP^+$ content, $NADP^+$/NADPH ratio, and mitochondrial citrate synthase activity in the soleus muscle of the CRD group were all lower than those in the BC group (all $P<0.01$). Compared with the BC group, the CRD group had down-regulated melatonin levels within 24 h, decreased protein expression levels of the core clock proteins brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1, circadian locomotor output cycles kaput, period 1 and cryptochrome circadian regulator 1 in the hypothalamus and soleus muscle (all $P<0.01$), as well as decreased expression levels of mitochondrial respiratory chain complex proteins and mitochondrial PGC-1α in the soleus muscle (all $P<0.05$). **Conclusion** Twelve-week CRD disrupts the 24-h secretory rhythm of serum melatonin in rats, downregulates the expression of core circadian clock proteins in the central nervous system and skeletal muscle, inhibits skeletal muscle mitochondrial biosynthesis and respiratory chain function, and ultimately causes skeletal muscle mass loss, a significant decline in grip strength and exercise endurance in rats.

［**Key words**］ circadian rhythm disruption; skeletal muscle biological clock; aerobic endurance; mitochondrial; respiratory chain

［**Citation**］ Gao Y, Cheng F, Yang T, et al. Circadian rhythm disruption impairs exercise endurance in rats: the mediating role of skeletal muscle biological clock dysfunction[J]. Acad J Naval Med Univ, 2026, 47(10): 1286-1295. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20250187.

昼夜节律是指生物体的行为、生理和生化反应呈现出近 24 h 的节律活动，这些节律受生物钟系统的调节控制。在哺乳动物中，生物钟系统是由位于下丘脑视交叉上核（suprachiasmatic nucleus，SCN）的中枢生物钟和位于骨骼肌等组织器官的外周生物钟组成，对调节生物体内在生物节律具有重要作用。

生物钟的维持主要受生物钟基因的调控，SCN 和骨骼肌生物钟基因振荡机制都由正向 / 负向转录－翻译反馈回路产生[1]，该调控机制主要涉及 2 个核心转录激活因子：脑和肌肉芳香烃受体核转运样蛋白 1（brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1，BMAL1）和昼夜节律运动输出周期崩坏蛋白（circadian locomotor output cycles kaput，CLOCK），两者形成异二聚体正向调节隐花色素蛋白（cryptochrome，CRY）家族和周期蛋白（period，PER）家族的表达。当 PER 和 CRY 蛋白超过临界水平时，将以二聚体的形式转移至细胞核中并抑制 BMAL1-CLOCK 的转录活性。另外，生物钟核心基因的节律性表达通过表观遗传、转录和翻译等不同方式调控下游钟控基因（clock-controlled gene）的表达，有效调节生物体细胞代谢、内分泌和免疫等多种生命活动[2-3]。

随着现在生活节奏的加快以及工作模式的转换，很多行业的从业人员都需要经历时差或者进行长期轮班工作，致使生物钟基因节律性失调，不仅增加了罹患癌症[4]、心血管疾病[5]及糖尿病、肥胖等代谢性疾病[6]的风险，而且对骨骼肌质量也产生不利影响[7]。*BMAL1* 和 *CLOCK* 作为骨骼肌核心生物钟基因，在骨骼肌生成以及线粒体功

能维持中发挥重要作用。有研究发现，全身性敲除 *Bmal1*$^{-/-}$小鼠和 *Clock*$^{\Delta 19}$ 基因突变小鼠都出现了肌丝结构破坏、收缩肌力下降、骨骼肌线粒体形态异常和功能障碍等现象[8]。本研究采用光周期诱导慢性时差的造模方式，从生物钟调控视角观察长期昼夜节律紊乱（circadian rhythm disruption，CRD）后骨骼肌功能、线粒体结构与功能的变化特征，明确长期 CRD 对骨骼肌质量及运动耐力的影响，以期为后续探索节律干预策略改善线粒体功能、提升运动耐力提供科学实验依据。

1　材料和方法

1.1　*实验动物与分组*　16 只 8 周龄 SPF 级健康雄性大鼠，体重 290～310 g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司［动物生产许可证号为 SCXK（京）2021-0011］。大鼠适应性饲养 2 周后随机分为空白对照（blank control，BC）组（n=8）和 CRD 组（n=8）。BC 组大鼠置于 12 h 光照 /12 h 黑暗的环境下饲养。CRD 组参照光周期诱导慢性时差的动物造模方法[9]，将大鼠置于 8 h 光照 /16 h 黑暗的周期环境下饲养，授时因子时间（zeitgeber time，ZT）以当周开灯时间为 ZT0，每周开灯时间延迟 4 h、连续 12 周进行昼夜光线轮换造模（图 1），构建 CRD 大鼠模型。SD 大鼠饲养于北京体育大学动物实验室内，环境温度 20～24 ℃，相对湿度 45%～55%，饲养期间自由摄食饮水。干预期间记录大鼠初始体重、每周体重，并观察大鼠活动和饮食状态。

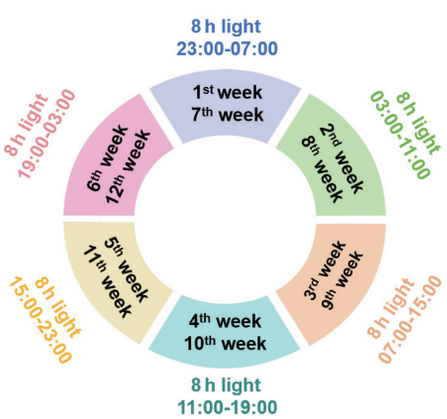

图 1　8 h 光照 /16 h 黑暗的周期环境方案

Fig 1　8 h light/16 h dark cycle protocol

1.2　*测试方案*

1.2.1　*运动耐力测试*　干预 12 周后，于上午 8:00 对两组大鼠进行运动耐力测试。具体测试方法：在坡度为 0°的动物实验跑台（型号 DSPT-208，杭州立泰医疗器械有限公司）上，以 10 m/min 的速度适应跑 5 min，然后调整跑速为 30 m/min，直到大鼠力竭，记录大鼠达到力竭的时间和跑动距离。力竭判断标准为大鼠不能在 30 m/min 的速度下继续运动，且电刺激 10 s 以上仍不能运动。

1.2.2　*抓力测试*　干预 12 周后，对两组大鼠进行抓力测试。测试前称量大鼠体重，并将仪器显示器数值归零。将大鼠置于抓力测力仪（型号 ZS-ZL，北京众实迪创科技发展有限责任公司）上，待其四肢抓牢后，抓住鼠尾并沿着水平方向均匀用力牵拉大鼠，直至大鼠四肢松开抓力板，此时抓力计上显示测试过程中大鼠的最大抓力。重复测量 5 次，记录数据并取平均值。

1.2.3　*大鼠全身骨骼肌重量测定*　使用双能 X 线骨密度仪（型号 DPX-NT，美国 GE HealthCare 公司）测定大鼠全身骨骼肌重量。校准双能 X 线骨密度仪后输入待测大鼠的标号、体重、体长等信息，按提示摆放大鼠并测量，测量过程中用小动物呼吸麻醉系统进行麻醉。

1.2.4　*尾动脉无创血压测试*　采用 CODA 无创血压系统（型号 CODA-MNTR，美国 Kent Scientific 公司）监测大鼠清醒安静状态下的收缩压、舒张压、平均动脉压和心率，测试过程中环境相对安静。预热设备并设定参数后，将大鼠固定在加热垫上并将容积压力传感器套在鼠尾根部，启动血压测试系统测量血压。每只大鼠先进行 5 次适应测试，之后连续测量 10 次，记录血压数据并取平均值。

1.3　*样品采集与处理*　测定大鼠运动耐力、四肢抓力、全身骨骼肌重量、血压、心率后，采用 25% 的氨基甲酸乙酯麻醉大鼠，待大鼠无自主活动时腹主动脉取血处死，分离双侧比目鱼肌、腓肠肌、胫骨前肌、趾长伸肌，称重并记录骨骼肌湿重。大鼠比目鱼肌离体后快速分块，用于冰冻切片包埋、透射电镜样本制备、蛋白质印迹法检测以及线粒体提取实验。

1.4　*骨骼肌线粒体提取*　采用线粒体试剂盒（货号 C3606，上海碧云天生物技术股份有限公司）提取骨骼肌线粒体。称取新鲜组织 50 mg，PBS 清洗后剪碎，加入 50 μL 预冷的 PBS 冰浴 3 min；600×g 离心 20 s，沉淀组织样品并弃上清；加入 100 μL 线粒体分离试剂重悬组织；600×g 离心 20 s，沉淀

组织样品并弃上清；加入 500 μL 预冷的线粒体分离试剂，冰浴匀浆 20～30 次后，4 ℃条件下 600×*g* 离心 5 min；转移上清后在 4 ℃条件下 11 000×*g* 离心 10 min；小心去除上清，沉淀即为线粒体。

1.5　比目鱼肌透射电镜样本制备　切取比目鱼肌横切面，2.5% 戊二醛固定 2 h 后，用磷酸缓冲液冲洗 3 次，每次 10 min；用 1% 锇酸固定 2 h 后，双蒸水冲洗 3 次，每次 10 min；分别用 50%、70%、90% 乙醇溶液梯度脱水 10 min，再用 100% 乙醇脱水 2 次，每次 15 min；经过环氧丙烷、树脂置换，用纯树脂包埋，随后修块、切片、观察。

1.6　比目鱼肌冰冻切片制备与免疫荧光染色及肌纤维横截面积定量　冰冻切片：调整仪器温度为－20 ℃，冰冻切片包埋剂固定底座并修整组织，切取 8 μm 组织厚度并固定在防脱载玻片上，用于免疫荧光染色。麦胚凝集素（wheat germ agglutinin，WGA）染色：用 4 % 多聚甲醛固定防脱载玻片（10 min），PBS 摇床洗涤 3 次，每次 15 min；滤纸吸干水分并画圈标注样本范围；在组织上滴加适量的 WGA 染色（10 μg/mL，PBS 稀释，1 ∶ 100，避光保存）；避光孵育 2 h；滤纸吸干染液并用 PBS 摇床洗涤 3 次，每次 15 min；滤纸吸干组织周围多余水分，滴加 DAPI 后盖玻片封片，4 ℃避光保存。在激光共聚焦显微镜下观察拍片。

比目鱼肌肌纤维横截面积计算方法：打开 ImageJ 1.54f 软件，打开保存的 WGA 染色切片，根据标尺转换成所需单位（μm）；把图片转换成黑白模式（8 bit），点击 image-adjust-threshold，让红色区域填满测量区域，调整边界清晰度；应用之后得到一张带边界的黑白图片，点击测量（计数 / 面积）进行计数，对于不完整的膜需补齐边缘，每张图片测量 3 次并取平均值。

1.7　ELISA 和生化检测

1.7.1　褪黑素和柠檬酸合酶含量　按照褪黑素 ELISA 试剂盒（货号 MM-0657R1，江苏酶免实业有限公司）、柠檬酸合酶 ELISA 试剂盒（货号 JL-37695，上海将来实业股份有限公司）说明书检测血清中褪黑素含量及骨骼肌线粒体中柠檬酸合酶含量。其中褪黑素检测覆盖两组大鼠 1 d 内 12 个时间点（ZT0、ZT2、ZT4、ZT6、ZT8、ZT10、ZT12、ZT14、ZT16、ZT18、ZT20 和 ZT22）的血清样本，分析其昼夜节律变化。

1.7.2　ATP 含量与氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（oxidized nicotinamide adenine dinucleotide phosphate，$NADP^+$）/ 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate，NADPH）比值测定　采用 ATP 检测试剂盒（货号 S0026，上海碧云天生物技术股份有限公司）测定比目鱼肌组织中 ATP 含量；采用 $NADP^+$/NADPH 检测试剂盒（货号 S0179，上海碧云天生物技术股份有限公司）WST-8 法测定未加热样品总烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（nicotinamide adenine dinucleotide phosphate，NADP）含量；60 ℃水浴加热 30 min 分解 $NADP^+$ 后测定 NADPH；$NADP^+$ 含量由总 NADP 减去 NADPH 计算得到，最后计算 $NADP^+$/NADPH 比值。所有检测操作流程严格遵照试剂盒说明书要求执行。

1.8　蛋白质印迹法检测比目鱼肌中线粒体呼吸链蛋白表达　提取组织蛋白：取 100 mg 比目鱼肌或 50 mg 下丘脑，加入配好的 RAPI 裂解液，剪碎匀浆后冰浴静置裂解 20 min，4 ℃条件下、13 320×*g* 离心 10 min 后取上清，根据 BCA 蛋白定量法（货号 XK357477，美国 ThermoFisher 公司）测定蛋白浓度，向上清液中分别加入裂解液和样本缓冲液，并将各组蛋白浓度调为一致。沸水浴中加热 15 min 完成变性后冷却分装。

蛋白质印迹法检测：采用 10% PAGE 彩色凝胶超快速配制试剂盒（货号 G2043-50T，武汉赛维尔生物科技有限公司）配制凝胶。上样后进行 SDS-PAGE 电泳，恒压 150 V 电泳 60 min；随后恒流 300 mA 转膜 90 min。将条带置于 3% 的脱脂牛奶中室温封闭 60 min；TBST 摇床洗膜 3 次，每次 10 min，后加入稀释好的一抗 4 ℃摇床孵育过夜，其中 PER1 抗体稀释浓度为 1 ∶ 2 000，BMAL1、CLOCK、隐花色素昼夜节律调节因子 1（cryptochrome circadian regulator 1，CRY1）、琥珀酸脱氢酶复合体铁硫亚基 B（succinate dehydrogenase complex iron sulfur subunit B，SDHB）、泛醌氧化还原酶亚基 B8（ubiquinone oxidoreductase subunit B8，NDUFB8）、电压依赖性阴离子通道 1（voltage-dependent anion channel 1，VDAC1）抗体种属来源为兔源，过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1α（peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1α，

PGC-1α）、GAPDH 抗体种属来源为大鼠源，稀释浓度均为 1 ∶ 1 000。一抗孵育 16 h 后，TBST 摇床洗膜 3 次，每次 10 min，加入 HRP 标记山羊抗兔 IgG、HRP 标记山羊抗大鼠 IgG（货号 ZB-2301、ZB-2307，北京中杉金桥生物技术有限公司），稀释浓度均为 1 ∶ 2 000，室温孵育 120 min。TBST 摇床洗膜 3 次，每次 10 min，后滴加化学发光试剂，使用化学发光成像系统采集条带图像，采用 Image Lab 5.1 软件分析条带灰度值。PER1、BMAL1、CLOCK、CRY1 蛋白的相对表达量以 GAPDH 灰度值标准化，PGC-1α、SDHB、NDUFB8 蛋白的相对表达量以 VDAC1 灰度值标准化。

1.9　统计学处理　采用 SPSS 23.0 软件对数据进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。所有数据先进行正态性检验和方差齐性检验；符合正态分布且方差齐性时，两组间比较采用独立样本 t 检验；符合正态分布但方差不齐时，则采用 Welch's 校正 t 检验。检验水准（α）为 0.05。

2　结　果

2.1　长期 CRD 对 SD 大鼠体重的影响　如图 2 所示，两组大鼠体重随干预时间延长均呈现增加趋势。CRD 组与 BC 组的初始体重及干预前 4 周内体重差异均无统计学意义（均 $P>0.05$）。干预后第 5 周、第 7～12 周 CRD 组大鼠体重均较 BC 组增加（均 $P<0.05$），说明长期 CRD 会导致大鼠体重增加。

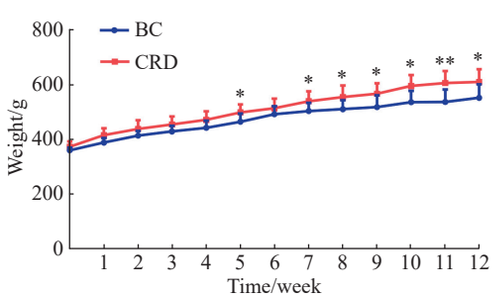

图 2　两组大鼠体重比较

Fig 2　Comparison of body weight between 2 groups of rats

The BC group rats were kept in a 12 h light/12 h dark environment, and the CRD group rats were kept in an 8 h light/16 h dark environment with the light-on time delayed by 4 h per week. $n=8$, $\bar{x}\pm s$. $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ vs BC group. BC: Blank control; CRD: Circadian rhythm disruption.

2.2　长期 CRD 对 SD 大鼠心率和血压的影响　干预 12 周后，BC 组大鼠的心率为（352.50±6.36）次/min，收缩压为（110.63±6.15）mmHg（1 mmHg＝0.133 kPa），舒张压为（90.00±6.18）mmHg，平均动脉压为（96.32±5.86）mmHg；CRD 组大鼠的心率为（385.50±14.72）次/min，收缩压为（133.89±6.29）mmHg，舒张压为（104.80±7.58）mmHg，平均动脉压为（114.37±6.26）mmHg。CRD 组大鼠的心率、收缩压、舒张压以及平均动脉压均高于 BC 组（均 $P<0.01$），提示长期 CRD 能够使心率加快、血压升高，不利于心血管功能。

2.3　长期 CRD 对 SD 大鼠血清褪黑素的影响　干预 12 周后，测量两组大鼠 1 d 内不同时间点的血清褪黑素水平，结果显示 ZT0、ZT8、ZT10、ZT18、ZT20 时 CRD 组大鼠的褪黑素水平均低于 BC 组（均 $P<0.05$），其余时间点两组间的差异无统计学意义（均 $P>0.05$，图 3）。1 d 内 CRD 组褪黑素的整体水平［（164.94±2.42）μg/mL］低于 BC 组［（145.40±4.14）μg/mL］，差异有统计学意义（$P<0.01$）。

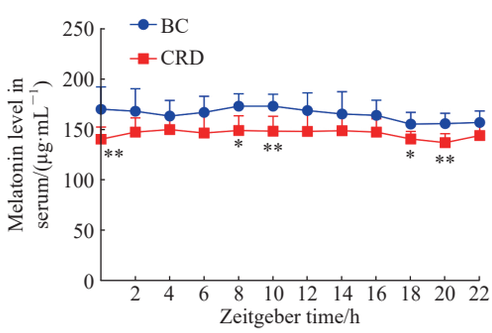

图 3　两组大鼠血清褪黑素水平比较

Fig 3　Comparison of serum melatonin levels between 2 groups of rats

The BC group rats were kept in a 12 h light/12 h dark environment, and the CRD group rats were kept in an 8 h light/16 h dark environment with the light-on time delayed by 4 h per week. $n=6$, $\bar{x}\pm s$. $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ vs BC group. BC: Blank control; CRD: Circadian rhythm disruption.

2.4　长期 CRD 对 SD 大鼠中枢和外周生物钟蛋白的影响　生物钟蛋白表达具有昼夜节律性，因此统一在第 12 周的上午 7:00 取材，比较两组同一时间点生物钟蛋白表达情况。如图 4 所示，与 BC 组相比，CRD 组大鼠的比目鱼肌（图 4A～4D）和下丘脑（图 4E～4H）中核心生物钟 BMAL1、CLOCK、CRY1、PER1 蛋白表达水平均下降（均 $P<0.01$），这表明长期 CRD 能够下调中枢和外周生物钟蛋白的表达。

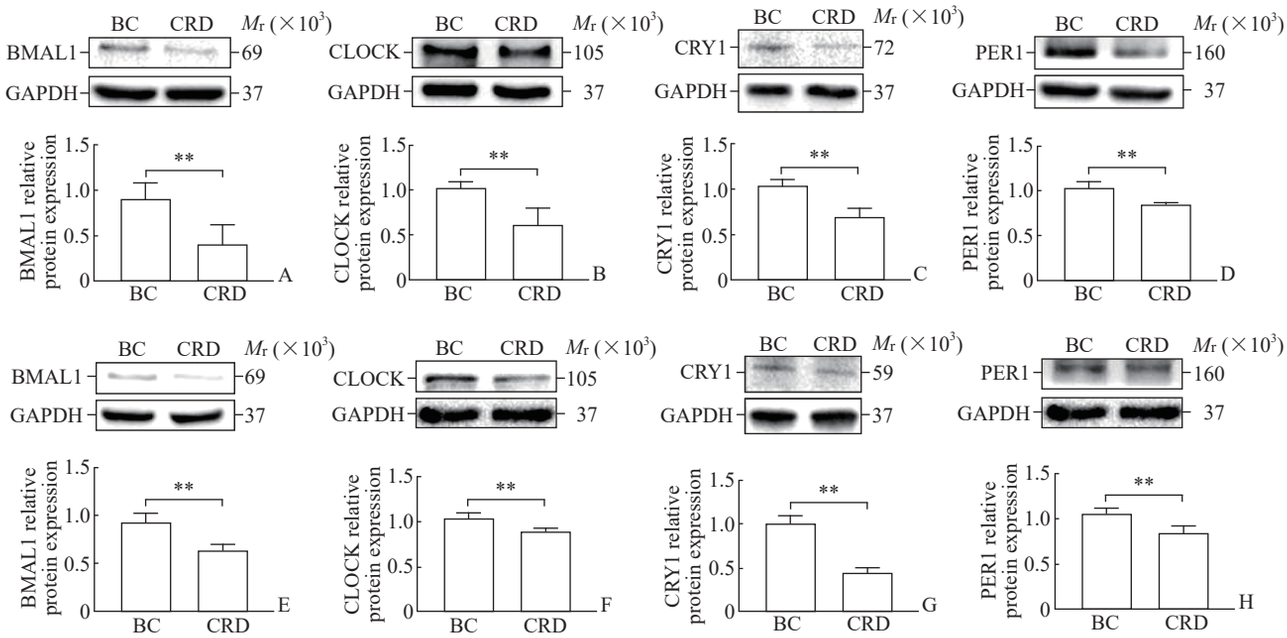

图 4　两组大鼠的比目鱼肌（A～D）、下丘脑（E～H）生物钟蛋白表达水平比较

Fig 4　Comparison of circadian clock protein expression levels in the soleus muscle (A-D) and hypothalamus (E-H) between 2 groups of rats

The BC group rats were kept in a 12 h light/12 h dark environment, and the CRD group rats were kept in an 8 h light/16 h dark environment with the light-on time delayed by 4 h per week. $n=6$, $\bar{x}\pm s$. $^{**}P<0.01$. BC: Blank control; CRD: Circadian rhythm disruption; BMAL1: Brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; CLOCK: Circadian locomotor output cycles kaput; CRY1: Cryptochrome circadian regulator 1; PER1: Period 1.

2.5　长期 CRD 对 SD 大鼠运动耐力、四肢抓力和骨骼肌结构与重量的影响　干预 12 周后的上午 8:00，对两组大鼠四肢抓力和运动耐力进行测试，在跑速为 30 m/min 的条件下 CRD 组大鼠四肢抓力（图 5A）和跑动时间（图 5B）均低于 BC 组（均 $P<0.01$）。干预前 BC 组与 CRD 组大鼠全身骨骼肌重量的差异无统计学意义（$P>0.05$），而干预 12 周后 CRD 组大鼠全身骨骼肌重量低于 BC 组（$P<0.05$，图 5C）。CRD 组大鼠比目鱼肌、趾长伸肌、腓肠肌及胫骨前肌湿重均低于 BC 组（均 $P<0.05$，图 5D、5E）。与 BC 组相比，CRD 组大鼠比目鱼肌肌纤维横截面积下降（$P<0.05$，图 5F、5G）。结果提示 12 周 CRD 后大鼠骨骼肌重量下降，且伴随着运动耐力和肌肉力量的下降。

2.6　长期 CRD 对 SD 大鼠骨骼肌线粒体超微结构的影响　采用透射电镜观察大鼠比目鱼肌中线粒体形态、肌丝排列、Z 线结构等超微特征：BC 组肌原纤维排列规整，Z 线边界清晰且整齐连续，线粒体多呈圆形或椭圆形、形态饱满，内部嵴结构完整，均匀分布在 Z 线两侧；CRD 组肌丝排列紊乱，Z 线边界模糊甚至局部消失，线粒体数量显著减少，可见巨型线粒体形成，部分线粒体内部嵴结构断裂、空泡化改变（图 6）。上述结果提示，12 周 CRD 可显著改变骨骼肌的正常超微结构，直接影响线粒体的数量与形态完整性。

2.7　长期 CRD 对 SD 大鼠比目鱼肌能量代谢相关指标的影响　与 BC 组相比，CRD 组比目鱼肌中 ATP、总 NADP（$NADP^+$+NADPH）、NADPH、$NADP^+$含量及 $NADP^+$/NADPH 比值均降低（均 $P<0.01$）；作为线粒体基质标志性限速酶的柠檬酸合酶含量也显著下降（$P<0.01$）。见图 7。

2.8　长期 CRD 对 SD 大鼠比目鱼肌线粒体呼吸链复合物蛋白及 PGC-1α 的影响　经过 12 周 CRD，CRD 组大鼠比目鱼肌中 SDHB、NDUFB8 以及线粒体生物合成蛋白 PGC-1α 的表达水平均较 BC 组下降（$P<0.05$ 或 $P<0.01$，图 8），这表明长期昼夜节律紊乱能够影响线粒体氧化磷酸化和线粒体生物合成。

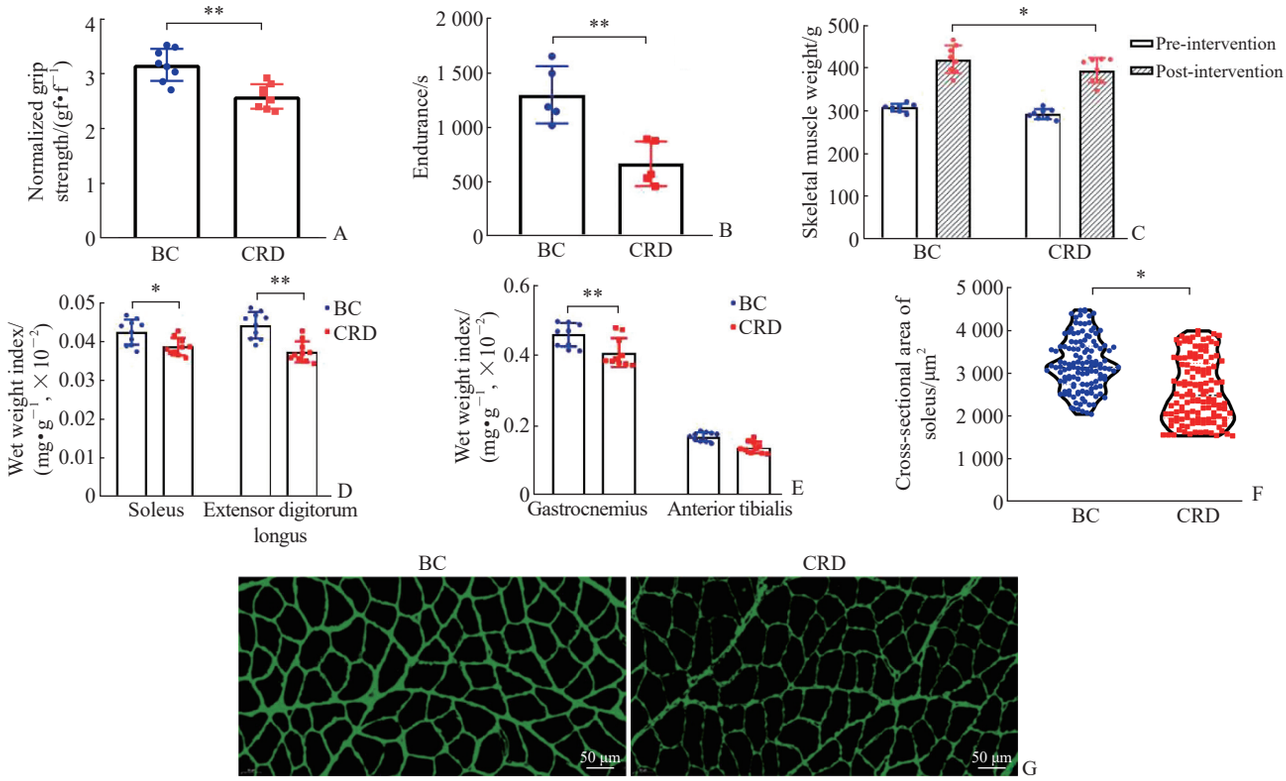

图 5　两组大鼠运动功能与骨骼肌相关指标比较

Fig 5　Comparison of motor function and skeletal muscle-related indicators between 2 groups of rats

The BC group rats were kept in a 12 h light/12 h dark environment, and the CRD group rats were kept in an 8 h light/16 h dark environment with the light-on time delayed by 4 h per week. A: Normalized grip strength (n=8); B: Exhaustive exercise endurance (n=5); C: Whole-body skeletal muscle weight measured by dual-energy X-ray absorptiometry (n=8); D: Soleus and extensor digitorum longus wet weight index (muscle wet weight/body weight) of left and right hindlimbs (n=5); E: Gastrocnemius and anterior tibialis wet weight index (muscle wet weight/body weight) of left and right hindlimbs (n=5); F: Muscle fiber cross-sectional area (n=5); G: Immunofluorescence staining of skeletal muscle cell membrane. $\bar{x}\pm s$. $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$. BC: Blank control; CRD: Circadian rhythm disruption.

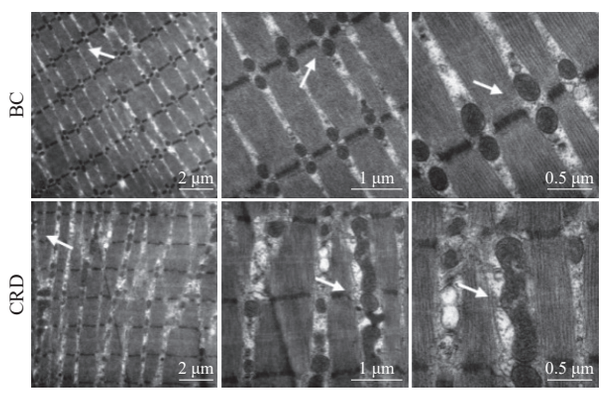

图 6　两组大鼠骨骼肌超微结构比较

Fig 6　Comparison of skeletal muscle ultrastructure between 2 groups of rats

White arrows indicate mitochondrial morphology and structure. The BC group rats were kept in a 12 h light/12 h dark environment, and the CRD group rats were kept in an 8 h light/16 h dark environment with the light-on time delayed 4 h per week. BC: Blank control; CRD: Circadian rhythm disruption.

3　讨　论

3.1　长期 CRD 对生物钟的影响　生物钟存在于哺乳动物的所有细胞和细胞器中，是一个内部计时系统，在维持正常生理活动中起着重要作用。核心生物钟蛋白 BMAL1 在维持昼夜节律稳态和调节各种细胞活动中发挥至关重要的作用，有研究发现剥夺睡眠诱导 CRD 模型鼠的牙周组织中 BMAL1 的表达水平低于对照组，提示 BMAL1 表达降低与昼夜节律改变有关[10]。本研究结果显示，经过 12 周干预后 CRD 组大鼠下丘脑和比目鱼肌中核心生物钟蛋白 BMAL1、CLOCK、PER1、CRY1 表达水平均低于 BC 组（均 $P<0.01$）。研究显示，轮班工作、经历时差反应以及睡眠紊乱的人群内源性生物钟与环境时间失调，是高血压、缺血性中风、心源性猝死的危险因素[11-12]，多项研究表明昼夜节律失调人群的收缩压和舒张压升高[13-14]。本研究通

过检测大鼠尾动脉血压发现，长时间 CRD 能够引起大鼠心率加快，安静状态下收缩压、舒张压以及平均动脉压均升高，这提示长期昼夜节律失调均可能对心血管功能造成损伤，甚至可能会引起器质性的病变。另外，研究显示 SCN 能够通过神经和内分泌系统将昼夜节律信号传递到外周组织，同步全身的昼夜节律振荡[15]。褪黑素作为体内中枢生物钟的替代标记物[16]，参与调节睡眠、部分昼夜节律功能以及垂体功能和肾上腺激素分泌[17-18]。本研究对大鼠 1 d 内多个时间点血清中褪黑素的变化进行检测，发现 CRD 组大鼠褪黑素水平较 BC 组下降。综上所述，长期 CRD 不仅能够下调机体的中枢生物钟、骨骼肌生物钟，还伴随着心率、血压和激素水平表达异常。长期轮班工作或生物钟紊乱的人群要尽量避免连续高强度工作或者进行大负荷的运动。

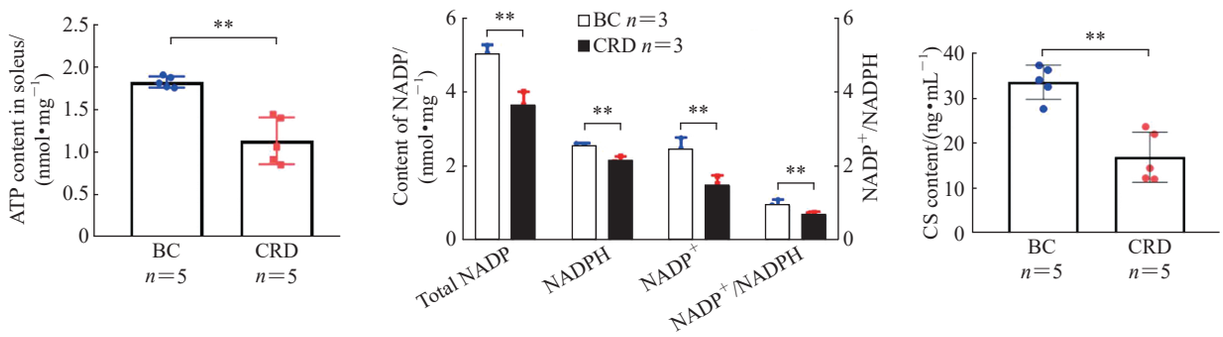

图 7　两组大鼠比目鱼肌能量代谢相关指标比较

Fig 7　Comparison of energy metabolism-related indicators of soleus muscle between 2 groups of rats

The BC group rats were kept in a 12 h light/12 h dark environment, and the CRD group rats were kept in an 8 h light/16 h dark environment with the light-on time delayed 4 h per week. $\bar{x}\pm s$. $^{**}P<0.01$. ATP: Adenosine triphosphate; BC: Blank control; CRD: Circadian rhythm disruption; NADP: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NADPH: Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; $NADP^+$: Oxidized nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; CS: Citrate synthase.

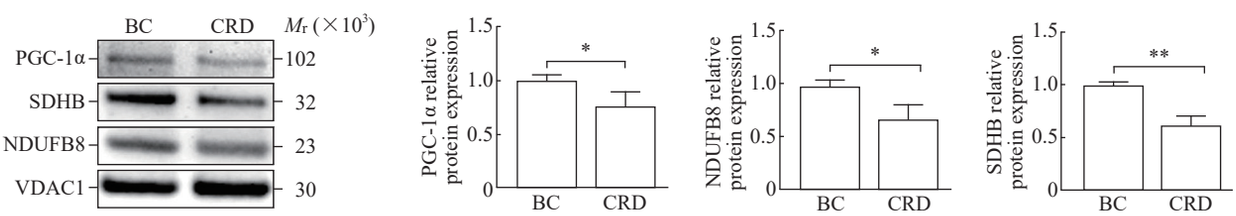

图 8　两组大鼠比目鱼肌线粒体中 PGC-1α、NDUFB8、SDHB 蛋白表达水平比较

Fig 8　Comparison of protein expression levels of PGC-1α, NDUFB8 and SDHB in soleus muscle mitochondria between 2 groups of rats

The BC group rats were kept in a 12 h light/12 h dark environment, and the CRD group rats were kept in an 8 h light/16 h dark environment with the light-on time delayed by 4 h per week. $n=8$, $\bar{x}\pm s$. $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$. PGC-1α: Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1α; NDUFB8: Ubiquinone oxidoreductase subunit B8; SDHB: Succinate dehydrogenase complex iron sulfur subunit B; BC: Blank control; CRD: Circadian rhythm disruption; VDAC1: Voltage-dependent anion channel 1.

3.2　长期 CRD 对骨骼肌功能的影响　骨骼肌作为运动和新陈代谢的重要组织，其结构和功能与运动能力密切相关。骨骼肌运动单位丧失、肌纤维类型改变、肌纤维萎缩或者神经肌肉激活减少，均可能会影响运动的速度和力量，进而导致运动能力下降[19]。研究证明生物钟与骨骼肌质量密切相关，维持正常的昼夜节律有利于增加蛋白质含量、提高线粒体质量、刺激骨骼肌细胞再生和修复，从而防止或减轻骨骼肌萎缩[20]。全身性敲除 *Bmal1*$^{-/-}$ 小鼠和 *Clock*$^{\Delta19/\Delta19}$ 基因突变小鼠都出现了肌丝结构破坏、收缩肌力下降、骨骼肌线粒体形态异常和功能障碍、运动耐受性降低，可能与 PGC-1α 和线粒体转录因子 A（mitochondrial transcription factor A，TFAM）的表达减少有关[21]，然而在 BMAL1 重新表达之后小鼠的运动能力和体重能够逐渐恢复[22]。本研究结果显示，长期 CRD 后，与 BC 组

相比，CRD 组大鼠全身骨骼肌重量和比目鱼肌、趾长伸肌、腓肠肌、胫骨前肌湿重均下降；比目鱼肌肌纤维横截面积缩小、运动耐力（跑动时间）和四肢抓力同步下降。线粒体作为维持细胞内稳态的重要细胞器，不仅能调节细胞的能量需求，还参与钙稳态、自噬和凋亡等过程，以调节骨骼肌质量[23]、维持肌肉耐力和四肢力量。本研究发现，CRD 组大鼠骨骼肌肌丝排列紊乱，Z 线模糊甚至消失，线粒体数量明显减少，线粒体嵴结构模糊甚至消失，出现巨型线粒体，这间接说明了长期 CRD 能够引起骨骼肌质量和力量下降，进而导致运动耐力和四肢抓力的下降。

3.3　长期 CRD 对骨骼肌线粒体功能的影响　昼夜节律控制着许多代谢过程，包括氧化磷酸化[24]、氧化还原状态[25]、脂质代谢[26]等。线粒体作为骨骼肌细胞“能量动力工厂”，主要通过氧化磷酸化将脂质和碳水化合物转化为 ATP，为细胞提供大部分能量。ATP 生成障碍不仅会直接影响机体正常代谢功能，引发糖尿病、阿尔茨海默病、肥胖和癌症等疾病，而且对机体的运动能力具有重要的影响。另外，烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（nicotinamide adenine dinucleotide，NAD）家族是连接昼夜节律与线粒体代谢的氧化还原分子，包含氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（oxidized nicotinamide adenine dinucleotide，NAD^+）/ 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（reduced nicotinamide adenine dinucleotide，NADH）以及 $NADP^+$/NADPH 两套氧化还原对。其中，NAD^+在线粒体三羧酸循环、脂肪酸与氨基酸氧化过程中被还原成 NADH，NADH 作为电子供体又参与氧化磷酸化与 ATP 合成[27-28]。与 NAD^+/NADH 主要参与能量生成不同，$NADP^+$/NADPH 是维持细胞抗氧化还原储备的重要辅酶，该辅酶对的稳态失衡可诱发氧化应激，损伤线粒体结构与功能。本研究结果显示，与 BC 组相比，CRD 组大鼠骨骼肌中 ATP、总 NADP、NADPH、$NADP^+$含量以及 $NADP^+$/NADPH 比值均降低，比目鱼肌线粒体中柠檬酸合酶和 NDUFB8、SDHB 蛋白表达均下降。这提示 CRD 可抑制线粒体三羧酸循环活性，降低呼吸链复合体蛋白Ⅰ和Ⅱ水平，减弱氧化磷酸化效率，引起 ATP 生成减少、线粒体功能受损；同时骨骼肌 NADP 总量下降、$NADP^+$/NADPH 氧化还原稳态失衡，也会引起线粒体功能受损。

另外，线粒体生物发生、应激反应、融合与分裂以及自噬在线粒体功能障碍中发挥重要的作用，而转录因子 PGC-1α 是线粒体生物发生的关键因子，可直接与生物钟基因发生相互作用。研究显示，全身性敲除 *Bmal1*$^{-/-}$小鼠和 *Clock*$^{\Delta 19}$ 基因突变小鼠均出现骨骼肌线粒体形态异常和功能障碍等现象，伴随着 PGC-1α 和 TFAM 的下降[8]。本研究结果显示，在长期 CRD 后 BMAL1 和 CLOCK 等核心生物钟蛋白表达下降，线粒体生物合成关键因子 PGC-1α 表达水平下降。这一结果与上述研究[8]结果一致，表明长期 CRD 能够引起线粒体合成下降，这可能是由于线粒体生物合成因子 PGC-1α 参与了生物钟基因转录－翻译反馈回路，其具体的作用机制还有待进一步研究。

综上所述，12 周 CRD 能够引起大鼠运动耐力和四肢抓力下降，且伴随着骨骼肌质量的降低，这可能是由于长期 CRD 导致 BMAL1 和 CLOCK 等核心生物钟蛋白表达下调，间接影响骨骼肌线粒体氧化磷酸化以及线粒体生物合成过程，导致骨骼肌线粒体功能发生障碍，其具体作用机制还有待进一步探讨。对于长期轮班工作人员或者远航的潜艇官兵等特殊人群来说，如何保证骨骼肌机能和运动耐力不受长期 CRD 引起的损害至关重要。未来可考虑进一步研究运动对长期 CRD 人员骨骼肌机能的预防和改善作用。

［参 考 文 献］

［1］ Choi Y, Cho J, No M H, et al. Re-setting the circadian clock using exercise against sarcopenia[J]. IJMS, 2020, 21(9): 3106. DOI: 10.3390/ijms21093106.

［2］ Selcho M, Millán C, Palacios-Muñoz A, et al. Central and peripheral clocks are coupled by a neuropeptide pathway in *Drosophila*[J]. Nat Commun, 2017, 8: 15563. DOI: 10.1038/ncomms15563.

［3］ Li X, Hu Y, Aslanbeigi F. Genetic and epigenetic alterations in night shift nurses with breast cancer: a narrative review[J]. Cancer Cell Int, 2025, 25(1): 20. DOI: 10.1186/s12935-025-03649-6.

［4］ Sulli G, Lam M T Y, Panda S. Interplay between circadian clock and cancer: new frontiers for cancer treatment[J]. Trends Cancer, 2019, 5(8): 475-494. DOI: 10.1016/j.trecan.2019.07.002.

［5］ Chellappa S L, Vujovic N, Williams J S, et al. Impact of circadian disruption on cardiovascular function and disease[J]. Trends Endocrinol Metab, 2019, 30(10):

767-779. DOI: 10.1016/j.tem.2019.07.008.

[6] Gabriel B M, Zierath J R. Circadian rhythms and exercise: re-setting the clock in metabolic disease[J]. Nat Rev Endocrinol, 2019, 15(4): 197-206. DOI: 10.1038/s41574-018-0150-x.

[7] Vitale J A, Bonato M, la Torre A, et al. The role of the molecular clock in promoting skeletal muscle growth and protecting against sarcopenia[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(17): 4318. DOI: 10.3390/ijms20174318.

[8] Andrews J L, Zhang X, McCarthy J J, et al. CLOCK and BMAL1 regulate MyoD and are necessary for maintenance of skeletal muscle phenotype and function[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(44): 19090-19095. DOI: 10.1073/pnas.1014523107.

[9] Ze Y, Wu Y, Tan Z, et al. Signaling pathway mechanisms of circadian clock gene *Bmal1* regulating bone and cartilage metabolism: a review[J]. Bone Res, 2025, 13(1): 19. DOI: 10.1038/s41413-025-00403-6.

[10] Liu X, Cao N, Liu X, et al. Circadian rhythm disorders aggravate periodontitis by modulating BMAL1[J]. Int J Mol Sci, 2022, 24(1): 374. DOI: 10.3390/ijms24010374.

[11] Ruan W, Li T, Bang I H, et al. BMAL1-HIF2A heterodimer modulates circadian variations of myocardial injury[J]. Nature, 2025, 641(8064): 1017-1028. DOI: 10.1038/s41586-025-08898-z.

[12] Pourcet B, Duez H. Nuclear receptors and clock components in cardiovascular diseases[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(18): 9721. DOI: 10.3390/ijms22189721.

[13] Chellappa S L, Gao L, Qian J, et al. Daytime eating during simulated night work mitigates changes in cardiovascular risk factors: secondary analyses of a randomized controlled trial[J]. Nat Commun, 2025, 16(1): 3186. DOI: 10.1038/s41467-025-57846-y.

[14] Koh J Y J, Tan C Y H, Li M, et al. The effectiveness of time-restricted eating as an intermittent fasting approach on shift workers' glucose metabolism: a systematic review and meta-analysis[J]. Nutrients, 2025, 17(10): 1689. DOI: 10.3390/nu17101689.

[15] Dibner C, Schibler U, Albrecht U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks[J]. Annu Rev Physiol, 2010, 72: 517-549. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021909-135821.

[16] Xie P, Xie X, Ye C, et al. Mammalian circadian clock proteins form dynamic interacting microbodies distinct from phase separation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2023, 120(52): e2318274120. DOI: 10.1073/pnas.2318274120.

[17] Posadzki P P, Bajpai R, Kyaw B M, et al. Melatonin and health: an umbrella review of health outcomes and biological mechanisms of action[J]. BMC Med, 2018, 16(1): 18. DOI: 10.1186/s12916-017-1000-8.

[18] Vasey C, McBride J, Penta K. Circadian rhythm dysregulation and restoration: the role of melatonin[J]. Nutrients, 2021, 13(10): 3480. DOI: 10.3390/nu13103480.

[19] Tieland M, Trouwborst I, Clark B C. Skeletal muscle performance and ageing[J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2018, 9(1): 3-19. DOI: 10.1002/jcsm.12238.

[20] Zhang H, Liang J, Chen N. Do not neglect the role of circadian rhythm in muscle atrophy[J]. Ageing Res Rev, 2020, 63: 101155. DOI: 10.1016/j.arr.2020.101155.

[21] Zhang X, Patel S P, McCarthy J J, et al. A non-canonical E-box within the MyoD core enhancer is necessary for circadian expression in skeletal muscle[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(8): 3419-3430. DOI: 10.1093/nar/gkr1297.

[22] Khapre R V, Kondratova A A, Patel S, et al. BMAL1-dependent regulation of the mTOR signaling pathway delays aging[J]. Aging, 2014, 6(1): 48-57.

[23] Mito T, Vincent A E, Faitg J, et al. Mosaic dysfunction of mitophagy in mitochondrial muscle disease[J]. Cell Metab, 2022, 34(2): 197-208.e5. DOI: 10.1016/j.cmet.2021.12.017.

[24] Peek C B, Affinati A H, Ramsey K M, et al. Circadian clock NAD^+ cycle drives mitochondrial oxidative metabolism in mice[J]. Science, 2013, 342(6158): 1243417. DOI: 10.1126/science.1243417.

[25] Pekovic-Vaughan V, Gibbs J, Yoshitane H, et al. The circadian clock regulates rhythmic activation of the NRF2/glutathione-mediated antioxidant defense pathway to modulate pulmonary fibrosis[J]. Genes Dev, 2014, 28(6): 548-560. DOI: 10.1101/gad.237081.113.

[26] Grimaldi B, Bellet M M, Katada S, et al. PER2 controls lipid metabolism by direct regulation of PPARγ[J]. Cell Metab, 2010, 12(5): 509-520. DOI: 10.1016/j.cmet.2010.10.005.

[27] Levine D C, Ramsey K M, Bass J. Circadian NAD(P)(H) cycles in cell metabolism[J]. Semin Cell Dev Biol, 2022, 126: 15-26. DOI: 10.1016/j.semcdb.2021.07.008.

[28] Yang R, Guo Z, Li B. NADH reductive stress drives metabolic reprogramming[J]. Trends Cell Biol, 2026, 36(3): 177-189. DOI: 10.1016/j.tcb.2025.07.005.

［本文编辑］　尹　荼