

下调心肌 CPT1b 的表达对肥胖小鼠心肌细胞钙调控的影响

张逸杰 夏 巍 曹 权 戴明彦 何文博 包明威

摘 要 **目的** 研究干扰心肌组织中肉毒碱脂酰转移酶-1b(CPT1b)的表达对高脂饮食诱导的肥胖小鼠心肌细胞钙调控的影响。**方法** 4周龄的雄性 C57 小鼠,随机分为正常对照组(N-mock)、肥胖对照组(O-mock)及肥胖干预组(O-CPT1b),采用高脂饮食诱导肥胖。6周龄时,经心肌分别注射靶向 CPT1b(O-CPT1b)或靶向无关基因(N-mock、O-mock)的重组慢病毒,以下调目标基因的表达。10周后,取小鼠左心室组织检测 RNA 干扰的效率;采用 Western blot 法检测左心室组织中肌浆网钙泵(SERCA2a)的蛋白表达;并分离单个心室肌细胞,使用活细胞工作站检测心肌细胞钙瞬变。**结果** 肥胖小鼠心肌组织中 CPT1b 的表达增加,慢病毒介导的 RNA 干扰显著下调其表达。肥胖引起心肌细胞 SERCA2a 的蛋白表达降低及肌质网钙处理能力的下降,下调 CPT1b 的表达增加了 SERCA2a 的含量,并改善了钙调控异常。**结论** 下调心肌组织中 CPT1b 的表达可改善肥胖所导致的心肌细胞钙调控异常。

关键词 肥胖模型 CPT1b RNA 干扰 钙调控异常 SERCA2a

中图分类号 R541.8

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.05.007

Effects of Cardiac-specific Carnitine Palmitoyltransferase-1b (CPT1b) Inhibition on Myocardial Calcium Handling. Zhang Yijie, Xia Wei, Cao Quan, et al. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University; Cardiovascular Research Institute of Wuhan University; Hubei Key Laboratory of Cardiology, Hubei 430060, China

Abstract Objective To study the effects of cardiac-specific CPT1b inhibition on myocardial calcium handling in high-fat-diet (HFD) induced obese mice. **Methods** Four-week-old male C57 mice were randomly divided into normal control group (N-mock), obese control group (O-mock) and obese intervention group (O-CPT1b). HFD was used to induce obesity in this study. At six weeks of age, mice were subjected to intramyocardial injection with recombinant lentivirus targeting murine CPT1b (for O-CPT1b) or irrelevant gene (for N-mock and O-mock) to down-regulate their expressions. Ten weeks later, left ventricular tissues were obtained. CPT1b mRNA and protein expressions were measured by RT-PCR and Western blot. The protein expression of sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2a (SERCA2a) was detected by Western blot. Isolated ventricular myocytes were obtained by enzymatic dissociation method, and used for myocardial calcium transient detection via live cell station. **Results** The mRNA and protein expressions of CPT1b were increased in obese mice hearts. Lentivirus-mediated RNAi significantly down-regulated cardiac CPT1b expression in O-CPT1b mice. Obesity decreased the protein expression of SERCA2a, and damaged calcium handling of sarcoplasmic reticulum as well. Cardiac CPT1b inhibition ameliorated the myocardial SERCA2a deficiency. Meanwhile, the calcium mishandling was improved in O-CPT1b mice hearts. **Conclusion** Cardiac-specific CPT1b suppression ameliorated myocardial calcium mishandling associated with obesity.

Key words Obese models; CPT1b; RNA interference; Calcium mishandling; SERCA2a

一项时间超过 30 年、空间跨度 188 个国家的研究表明,全球肥胖或超重人群已达 21 亿,这差不多相当于 30% 的地球人口。当今世界各国的肥胖人群仍

在不断增多,其中 2/3 来自发展中国家。肥胖已成为 21 世纪最重要的健康问题之一^[1]。大量临床研究证实,肥胖可以引起心脏重构^[2-4],早期常表现为左心室舒张功能异常,伴或不伴收缩功能障碍,最终可进展为心力衰竭。钙调控是心肌细胞兴奋-收缩偶联的关键环节,其异常是心脏重构和心力衰竭的直接原因^[5]。在生理情况下,心肌细胞主要通过脂肪酸(fatty acids, FA) β 氧化及葡萄糖有氧氧化生成 ATP 满足自身能耗^[6]。病理性肥胖时常有胰岛素抵抗,心

基金项目:国家自然科学基金资助项目(面上项目)(81570460);
国家自然科学基金青年科学基金资助项目(81500668)

作者单位:430060 武汉大学人民医院心内科、武汉大学心血管病研究所、心血管病湖北省重点实验室

通讯作者:包明威,主任医师,副教授,硕士生导师,电子信箱:
mbao@whu.edu.cn

肌细胞利用葡萄糖受阻,转而近乎单一地依赖 FA 的 β 氧化供能^[7]。这种能量代谢谱的改变使 β 氧化的毒性副产物生成增多,超出细胞的清除能力而损伤肌质网^[8]。肌质网是心肌细胞内钙离子(Ca^{2+})储存的主要场所,其功能受损势必引起胞内 Ca^{2+} 调节障碍^[9]。FA 代谢率的增加还可导致氧化磷酸化解偶联,线粒体 ATP 生成效率降低,肌质网钙泵(sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2a, SERCA2a)的活性减低,进一步加剧心肌细胞钙调控异常^[10]。

肉毒碱脂酰转移酶 1b(carnitine palmitoyltransferase-1b, CPT1b)是 FA 分解代谢过程中的限速酶,该酶分布于线粒体外膜,介导 FA 从胞质转运至线粒体内参与 β 氧化。有研究发现,肥胖时 CPT1b 在心肌组织中的表达增加^[11]。下调 CPT1b 的表达可能通过降低 FA 高代谢率而改善钙调控异常。笔者构建了靶向 CPT1b 的慢病毒,通过 RNA 干扰下调肥

胖小鼠心肌 CPT1b 的表达,研究此干预对心肌细胞钙调控的影响。

材料与方法

1. 实验动物及研究方案:SPF 级 4 周龄雄性 C57 小鼠,体重 $17.46 \pm 0.43\text{g}$,随机分为正常对照组(N-mock)、肥胖对照组(O-mock)及肥胖干预组(O-CPT1b),饲养于武汉大学人民医院动物实验中心屏障环境。环境温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$,湿度 45%~50%,光照/黑暗比 12h:12h。N-mock 给予正常饮食(D12450B,含 10%脂肪、20%蛋白及 70%的糖类),O-mock、O-CPT1b 给予高脂饮食(D12492,含 60%脂肪、20%蛋白及 20%的糖类)诱导肥胖。小鼠及饲料均购自北京华阜康生物科技有限公司。6 周龄时,经心肌注射靶向 CPT1b(O-CPT1b)或靶向无关基因(N-mock、O-mock)的重组慢病毒,16 周龄时取材检测(图 1)。所有操作严格遵循实验动物使用的“3R 原则”。

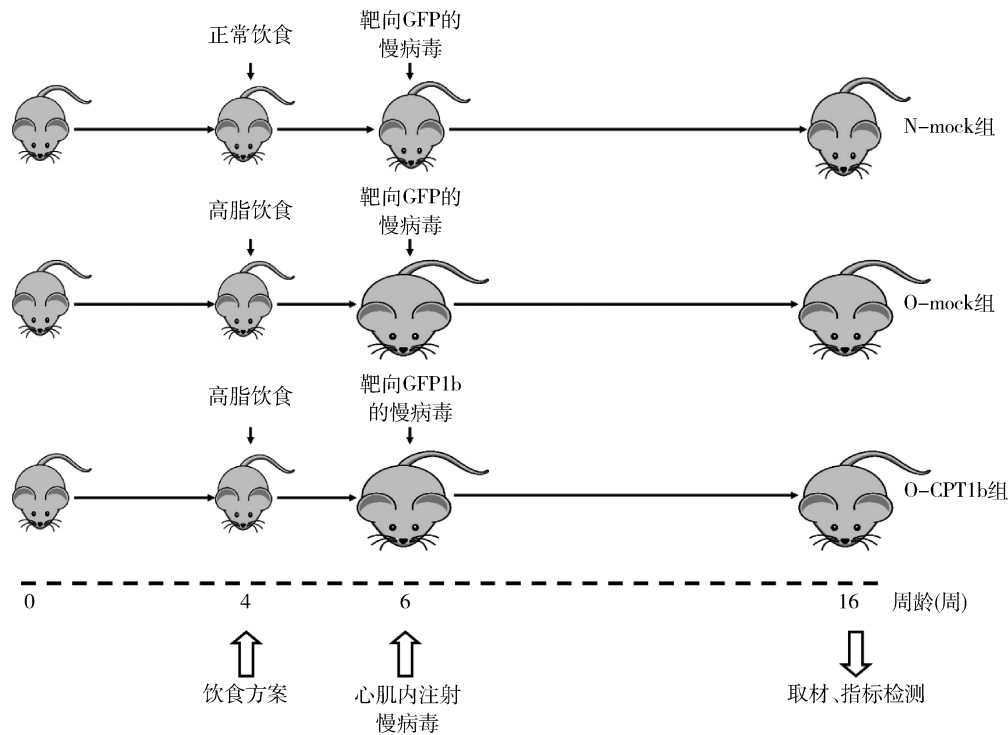


图 1 研究方案

小鼠自断乳后给予正常饮食,4 周龄起根据分组给予不同的喂养方案,6 周龄时经心肌注射慢病毒下调目标基因的表达,16 周龄时取材检测

2. 仪器与试剂:主要仪器包括实时定量 PCR 仪(CFX96,美国 Bio-Rad 公司)、恒流泵(LEAD-2,英国 Longer 公司)、活细胞工作站(AF6000,德国 Leica 公司)、倒置显微镜(DMI6000B,德国 Leica 公司)、超高速相机(DFC550,德国 Leica 公司)等。主要试剂包括 TRIzol(15996-026,美国 Thermo Fisher 公司)、反转录试剂盒(FSQ-101,上海东洋纺生物科技有限

公司)、SYBR Green 试剂盒(FP205,北京天根生化科技有限公司)、RIPA 裂解液(sc-24948,美国 Santa Cruz 公司)、BCA 蛋白定量试剂盒(P0012S,上海碧云天生物技术有限公司)、CPT1b 一抗(GTX117231,美国 GeneTex 公司)、GAPDH 一抗(CW0100A,北京康为世纪生物科技有限公司)、SERCA2a 一抗(Ab2861,英国 Abcam 公司)、II 型胶原酶(C6885-1G,美国

Sigma - Aldrich 公司)、Fluo - 4, AM (F14201, 美国 Thermo Fisher 公司)。

3. 慢病毒制备: 研究所用慢病毒由中科院上海生命科学研究院的褚亮博士提供。选取 CPT1b 作为 RNA 干扰的目标基因, 另选取无关的绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 基因作为对照。构建靶向小鼠 CPT1b: 5' - CCG GGA CCC TGG ATG AAG ATT CTC TCG AGA GAA TCT TCA TCC AGG GTC TTT TTG - 3' 及 GFP: 5' - CCG GTC ACC TTC ACC CTC TCC ACT TCT CGA GAA GTG GAG AGG GTG AAG GTG ATT TTT G - 3' 的慢病毒载体用于心肌注射。病毒效价 $\approx 1 \times 10^7$ 微粒/毫升。

4. 心肌内注射介导定向 RNA 干扰: 心肌注射的方法参照既往的描述^[12]。使用戊巴比妥钠麻醉小鼠后, 于心前区沿左锁骨中线作一长约 1cm 切口, 沿切口缝制荷包松结备用。使用蚊氏血管钳经第 4 肋间做一小的胸腔开窗, 将心脏经由此开口推挤至体表。使用微量注射针 (针尖外径 31gauge) 向左心室内注射慢病毒共 10 μ l, 稍停顿后缓慢撤针。还纳心脏后立即排出胸腔内残气, 收紧荷包关胸。手术中心脏外露时间短于 30s。

5. 实时荧光定量 PCR: 参照试剂盒说明书, 使用 TRIzol 法提取心室组织总 RNA, 并合成 cDNA, 再按 SYBR Green 试剂盒说明书进行实时荧光定量 PCR。选取 GAPDH 作为内参。引物序列如下: CPT1b 正向引物: 5' - CCC ATG TGC TCC TAC CAG AT - 3', 反向引物: 5' - CCT TGA AGA AGC GAC CTT TG - 3'; GAPDH 正向引物: 5' - CTC ATG ACC ACA GTC CAT GC - 3', 反向引物: 5' - GGA TGA CCT TGC CCA CAG CC - 3'。

6. Western blot 法检测: 使用 RIPA 裂解液从心室组织中提取总蛋白, BCA 法进行蛋白定量, SDS - PAGE 分离蛋白, 电转至 PVDF 膜, 经一抗、二抗孵育, 显影、定影获得凝胶图像。实验中的一抗浓度为 CPT1b 1:500, GAPDH 1:1000, SERCA2a 1:1000。凝胶图像采用 Image J 软件分析。

7. 活细胞工作站检测心肌细胞钙瞬变: 小鼠 16 周龄时, 经腹腔依次注射肝素 (5U/g 体重) 和戊巴比妥钠 (90 μ g/g 体重), 麻醉后剪取完整心脏, 经主动脉插管逆行灌流。使用氧合的含 II 型胶原酶 (0.33mg/ml) 的无钙台氏液消化 8 ~ 10min 至心脏透明、变软, 剪下左心室置于无钙台氏液内终止消化。充分剪碎左心室, 使用吸管轻柔吹散细胞, 再经 150 μ m 孔径的

尼龙筛网过滤, 确保分离出单个的心室肌细胞^[13]。在 40min 内梯度复钙至 Ca^{2+} 浓度 0.4mmol/L。将单细胞悬液离心后用 1ml 正钙台氏液 (Ca^{2+} 浓度 1.8mmol/L) 重悬, 加入 9 μ mol/L 的 Fluo - 4, AM 钙荧光探针, 37℃ 避光孵育 60min。之后使用含阴离子转运体抑制剂 Sulfapyrazone (0.1 μ mol/L) 的正钙台氏液离心、重悬 3 次, 以去除未进入细胞的探针。所得细胞悬液置室温避光孵育 60min, 使进入细胞的 Fluo - 4, AM 充分脂解^[14]。向自制灌流槽中加入稀释后的上述细胞悬液, 置于活细胞工作站的倒置显微镜载物台上。待细胞贴壁后, 选取横纹清晰、形态完整、表面光洁、折光性强且无自发收缩的心肌细胞, 通过固定在灌流槽两端的铂金丝, 以高于阈刺激强度 30% 的电压给予场刺激, 刺激波宽 2ms。选定感兴趣区域 (area of interest, AOI), 设置激发/接收波长 494/516nm, 在基础状态和频率为 0.5Hz 及 1.0Hz 的场刺激下, 观察 AOI 内平均钙荧光强度的动态变化。

8. 统计学方法: 采用 SPSS 18.0 统计软件进行统计学分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组样本均数的比较采用单因素方差分析, 均数间两两比较采用 Tukey 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 高脂饮食诱导了小鼠肥胖模型: 通过 12 周的饮食干预, 高脂饮食小鼠的体重较正常饮食小鼠显著增加 (O - mock 组 $34.63 \pm 1.10\text{g}$ vs N - mock 组 $28.90 \pm 0.92\text{g}$, $P = 0.000$)。心肌内注射不同的慢病毒对体重的影响差异无统计学意义 (O - mock 组 $34.63 \pm 1.10\text{g}$ vs O - CPT1b 组 $35.24 \pm 0.99\text{g}$, $P > 0.05$, 图 2)。

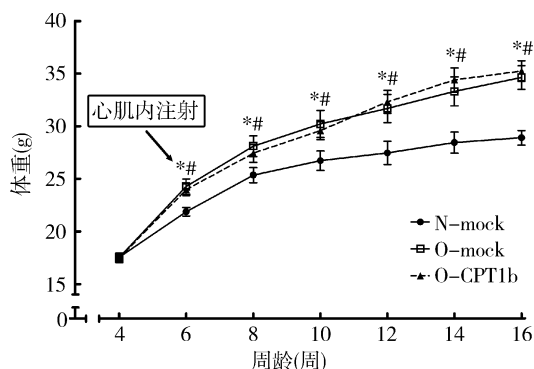


图 2 小鼠体重变化

不用饮食方案对小鼠体重的影响 (每组 $n = 8$)。N - mock 与 O - mock 相比, * $P = 0.000$; N - mock 与 O - CPT1b 相比, # $P = 0.000$

2. RNA 干扰下调了心肌 CPT1b 的表达: RT - PCR 结果提示,肥胖引起心肌 CPT1b 的 mRNA 表达上调约 50% (O - mock 组 1.49 ± 0.27 vs N - mock 组 1.00 ± 0.18 , $P < 0.05$),慢病毒介导的 RNA 干扰显著减少了心肌中约 60% (O - CPT1b 组 0.58 ± 0.21 vs O - mock 组 1.49 ± 0.27 , $P < 0.01$) 的 CPT1b 的 mRNA 表达 (图 3A)。Western blot 法检测结果显示,

肥胖引起 CPT1b 的蛋白表达增加约 30% (O - mock 组 1.31 ± 0.21 vs N - mock 组 1.00 ± 0.19 , $P < 0.05$),RNA 干扰减少了 O - CPT1b 组小鼠心肌组织中约 50% (O - CPT1b 组 0.68 ± 0.29 vs O - mock 组 1.31 ± 0.21 , $P < 0.01$) 的 CPT1b 的蛋白表达 (图 3 中 B、C)。

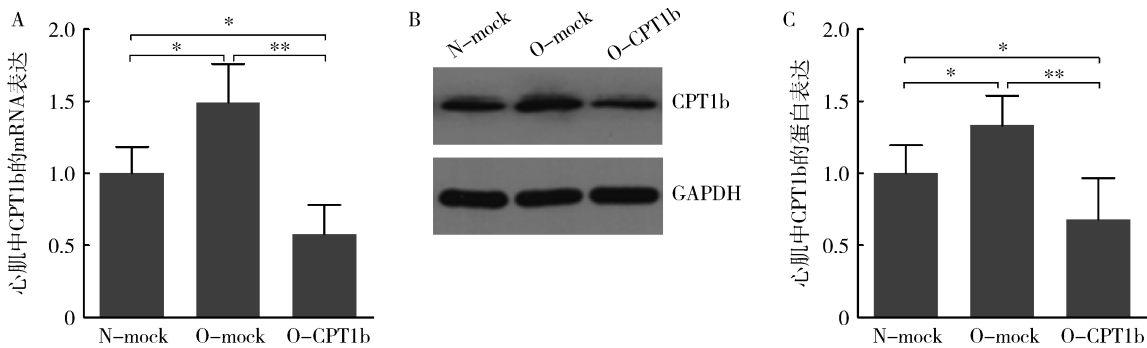


图 3 心肌组织中 CPT1b 的 mRNA 和蛋白表达

A. real - time RT - PCR 提示,肥胖引起小鼠心肌组织 CPT1b 的 mRNA 表达增加,心肌内注射慢病毒显著下调了 O - CPT1b 小鼠 CPT1b 的 mRNA 表达 (每组 $n = 3$); B. Western blot 法检测的代表性图片,以 GAPDH 作为内参; C. Western blot 法检测的统计结果显示,肥胖引起心肌 CPT1b 的蛋白表达增加, RNA 干扰显著降低 O - CPT1b 小鼠心肌 CPT1b 的蛋白表达 (每组 $n = 3$); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3. 下调 CPT1b 的表达增加了心肌 SERCA2a 的含量: SERCA2a 是心肌细胞内 Ca^{2+} 调节的主要蛋白,其表达量减少将引起心肌细胞舒缩功能障碍^[15]。经过 12 周的高脂喂养, Western blot 法检测结果提示, O - mock 小鼠心肌组织中 SERCA2a 的蛋白表达较

N - mock 小鼠减少了 34% (O - mock 组 0.66 ± 0.10 vs N - mock 组 1.00 ± 0.13 , $P < 0.05$); 下调肥胖小鼠心肌组织中 CPT1b 的表达显著增加 SERCA2a 的蛋白表达至正常对照水平 (O - CPT1b 组 0.92 ± 0.17 vs O - mock 组 0.66 ± 0.10 , $P < 0.05$, 图 4)。

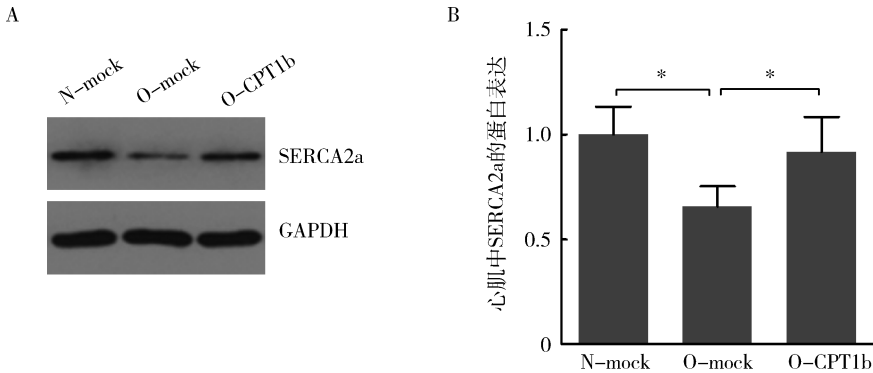


图 4 心肌组织中 SERCA2a 的蛋白表达变化

A. Western blot 法检测的代表性凝胶图像,以 GAPDH 作为内参; B. 蛋白定量的结果提示,肥胖引起心肌 SERCA2a 的蛋白表达降低,下调心肌 CPT1b 的表达改善了肥胖所导致的 SERCA2a 减少 (每组 $n = 3$)。* $P < 0.05$

4. 下调 CPT1b 的表达改善了心肌细胞钙调控: 钙瞬变幅度、钙瞬变速率及钙瞬变半恢复时间 ($T_{50\%}$) 是反映心肌细胞对 Ca^{2+} 调节能力的参数,与心肌的收缩、舒张功能密切相关^[14]。使用频率分别为 0.5 Hz 和 1.0 Hz 的场刺激诱发心肌细胞钙瞬变 (图 5

中 A ~ C), 结果均提示, O - mock 小鼠的钙瞬变幅度较 N - mock 小鼠显著减低 (0.5 Hz 场刺激时 O - mock 组 2.26 ± 0.33 vs N - mock 组 2.87 ± 0.35 , $P < 0.05$; 1.0 Hz 场刺激时 O - mock 组 2.02 ± 0.25 vs N - mock 组 2.47 ± 0.28 , $P < 0.05$), 下调 CPT1b 的表

达逆转了上述改变(0.5Hz 场刺激时 O - CPT1b 组 2.77 ± 0.29 vs O - mock 组 2.26 ± 0.33 , $P < 0.05$; 1.0Hz 场刺激时 O - CPT1b 组 2.43 ± 0.23 vs O - mock 组 2.02 ± 0.25 , $P < 0.05$; 图 5 中 D、G); 高脂饮食及 RNA 干扰对钙瞬变速率的影响差异无统计学意义(图 5 中 E、H); O - mock 小鼠的 $T_{50\%}$ 较 N - mock 小鼠显著延长(0.5Hz 场刺激时 O - mock 组 468.97 ± 34.54 ms vs N - mock 组 409.65 ± 23.84 ms, $P < 0.05$;

1.0Hz 场刺激时 O - mock 组 363.67 ± 24.54 ms vs N - mock 组 313.65 ± 21.84 ms, $P < 0.05$), 下调 CPT1b 的表达缩短 $T_{50\%}$ 至正常对照水平(0.5Hz 场刺激时 O - CPT1b 组 401.16 ± 33.47 ms vs O - mock 组 468.97 ± 34.54 ms, $P < 0.05$; 1.0Hz 场刺激时 O - CPT1b 组 327.16 ± 23.47 ms vs O - mock 组 363.67 ± 24.54 ms, $P < 0.05$; 图 5 中 F、I)。

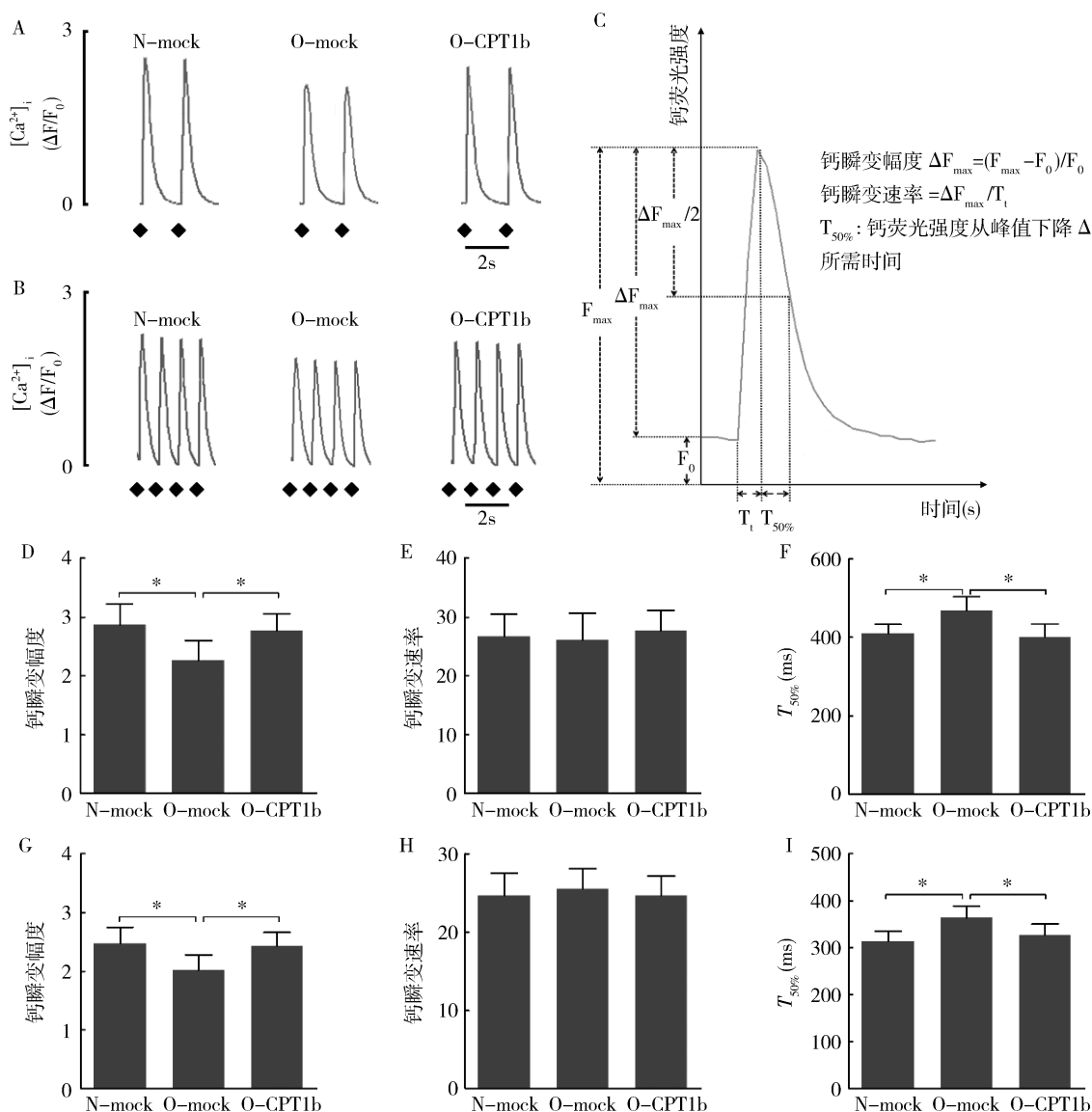


图 5 心肌细胞钙瞬变

A、B. 频率分别为 0.5Hz 和 1.0Hz 的场刺激所诱发的心肌细胞 Fluo-4 钙瞬变 ($\Delta F/F_0$) 的代表性图片, 黑色菱形代表场刺激发放的时间点; C. 钙瞬变相关参数的测量及计算方法; D、E、F. 0.5Hz 的场刺激诱发钙瞬变所计算得到的钙瞬变幅度、钙瞬变速率及 $T_{50\%}$ (每组 $n = 4 \sim 6$, 每只小鼠分析 5 ~ 6 个细胞); G、H、I. 1.0Hz 的场刺激诱发钙瞬变所计算得到的钙瞬变幅度、钙瞬变速率及 $T_{50\%}$ (每组 $n = 4 \sim 6$, 每只小鼠分析 5 ~ 6 个细胞); $[Ca^{2+}]_i$: 心肌细胞内钙含量; F_0 : 基线钙荧光强度; ΔF : 钙荧光变化值; T_t : 钙瞬变时间; $T_{50\%}$: 钙瞬变半恢复时间; * $P < 0.05$

讨 论

Ca^{2+} 是肌细胞收缩的关键因素,在生理情况下,心肌细胞内 Ca^{2+} 浓度随动作电位呈周期性波动,使心肌细胞产生收缩和舒张运动。在收缩期,膜电位去极化激活 L 型钙通道,使少量 Ca^{2+} 进入胞内,随后激活肌质网 Ryanodine 受体 2 (ryanodine receptor 2, RyR2) 通道,使肌质网内 Ca^{2+} 大量释放到胞质,引起心肌细胞收缩;在舒张期, SERCA2a 将胞质内 Ca^{2+} 重新泵回肌浆网,同时细胞膜上的钠 - 钙交换体将 Ca^{2+} 转运至细胞外,使胞质内 Ca^{2+} 浓度降低,心肌细胞舒张。RyR2 通道和 (或) SERCA2a 的异常,如 RyR2 通道的门控异常、SERCA2a 数量下调和效率降低等,均可损害胞内 Ca^{2+} 的正常调控,导致胞质内钙超载和肌质网内钙储备减少^[5]。病理性肥胖或糖尿病时,外周血中 FA 水平升高,位于心肌细胞质的脂肪酸转位酶转移至胞膜,介导大量 FA 摄取入胞^[16];而 CPT1b 的表达上调,则促使更多的 FA 从胞质进入线粒体^[11]。上述条件使心肌细胞内 FA 的 β 氧化率显著增加,其有害副产物活性氧自由基的含量亦显著增多,超出机体的清除能力而导致内质网应激^[17]。肌质网是肌细胞内特化的滑面内质网,参与心肌细胞动作电位的 Ca^{2+} 约 90% 来源于肌质网腔^[15]。因此,肌质网摄取和释放 Ca^{2+} 的能力对心肌细胞舒张和收缩功能至关重要,其损伤必然导致心肌细胞钙调控异常。

肥胖性心脏重构患者往往首先出现心室舒张功能的障碍,其可能的机制包括:①心肌细胞 FA 代谢率过高,在氧供一定的情况下,ATP 的生成效率降低。由于 Ca^{2+} 回摄是主动耗能的过程,ATP 的相对缺乏将导致 SERCA2a 活性减低,肌质网对 Ca^{2+} 的摄取和兴奋 - 收缩偶联机制发生障碍,延缓心肌细胞的舒张过程;②FA 分解代谢产生的大量活性氧自由基损害线粒体功能,引起氧化磷酸化解偶联,ATP 生成效率进一步降低,加剧上述效应^[10];③氧自由基介导的内质网应激还引起 SERCA2a 的蛋白表达减少,加剧 Ca^{2+} 回摄障碍;④高浓度的 FA 积聚于胞质激活细胞膜 Ca^{2+} 通道,使过多的胞外 Ca^{2+} 进入胞内,引起胞质内钙超载,加重 SERCA2a 的工作负荷^[7]。

本研究结果显示,肥胖小鼠心肌细胞的钙瞬变幅度显著降低 (图 5 中 D、G),推测是由于 SERCA2a 的表达和活性降低,肌质网在舒张期摄取 Ca^{2+} 的能力下降,致胞质内钙超载;在收缩期,肌质网释放 Ca^{2+} 相应减少,引起钙瞬变幅度下降。钙瞬变幅度降低通

过兴奋 - 收缩偶联可引起心肌收缩功能下降,该机制在心脏重构晚期合并收缩功能障碍时起重要作用。肥胖未引起钙瞬变速率的显著改变 (图 5 中 E、H),说明心肌细胞内“钙触发钙释放”的过程并不受 FA 高代谢率的影响。而肥胖小鼠的 $T_{50\%}$ 显著增加 (图 5 中 F、I),提示肌质网在舒张期摄取 Ca^{2+} 的速度减慢,进一步印证 FA 高代谢率损害肌质网的摄钙功能。

本研究通过定向干扰 CPT1b 的表达,理论上可以抑制心肌细胞内过多的 FA 由胞质转运入线粒体。尽管笔者没有直接检测心肌内 FA 的 β 氧化率,但结合 O - CPT1b 小鼠心肌 SERCA2a 表达增加和钙调控参数改善的研究结果,笔者可以推测:下调心肌 CPT1b 的表达减少了心肌细胞内 FA 的 β 氧化,消除了活性氧自由基的过度生成,从来源上抑制了后者对肌质网的损伤,从而增加了 SERCA2a 的蛋白表达 (图 4),改善了肥胖小鼠心肌细胞的钙调控 (图 5)。

综上所述,CPT1b 在肥胖所致的心肌细胞钙调控异常中起重要作用,CPT1b 是一个潜在的治疗代谢性心脏重构的靶点。

参考文献

- Ng M, Fleming T, Robinson M, *et al.* Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980 - 2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 [J]. *Lancet*, 2014, 384(9945):766 - 781
- Sanchez AA, Singh GK. Early ventricular remodeling and dysfunction in obese children and adolescents [J]. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*, 2014, 16(10):340
- Monte IP, Mangiafico S, Buccheri S, *et al.* Early changes of left ventricular geometry and deformational analysis in obese subjects without cardiovascular risk factors: a three - dimensional and speckle tracking echocardiographic study [J]. *Int J Cardiovasc Imaging*, 2014, 30(6):1037 - 1047
- Kishi S, Armstrong AC, Gidding SS, *et al.* Association of obesity in early adulthood and middle age with incipient left ventricular dysfunction and structural remodeling: the CARDIA study (Coronary Artery Risk Development in Young Adults) [J]. *JACC Heart Fail*, 2014, 2(5):500 - 508
- Carvajal K, Balderas - Villalobos J, Bello - Sanchez MD, *et al.* Ca mishandling and cardiac dysfunction in obesity and insulin resistance: Role of oxidative stress [J]. *Cell Calcium*, 2014, 56(5):408 - 415
- Hue L, Taegtmeier H. The Randle cycle revisited: a new head for an old hat [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 297(3):E578 - 591
- An D, Rodrigues B. Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 291(4):H1489 - 1506

(下转第 158 页)

尿病患者易发动脉粥样斑块,且这一的斑块并不十分稳定,容易在破裂后形成微栓子,进而导致脑梗死^[16]。

综上所述,MTHFR 基因 C667T 多态性与体内的 Hcy 水平相关,且 MTHFR 基因 C667T 多态性和糖尿病均是导致脑梗死发生的危险因素。MTHFR 基因 C667T 突变的检测可以为脑梗死的预防提供依据,降低脑梗死的发生率。

参考文献

- Lee JH, Choi HC, Kim C, *et al.* Fulminant cerebral infarction of anterior and posterior cerebral circulation after ascending type of facial necrotizing fasciitis[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2014, 23(1): 173 – 175
- Fu HJ, Zhao LB, Xue JJ, *et al.* Elevated serum homocysteine (Hcy) levels may contribute to the pathogenesis of cerebral infarction[J]. J Mol Neurosci, 2015, 56(3): 553 – 561
- Delpont D, Schoeman R, VanDerMerwe N, *et al.* Significance of dietary folate intake, homocysteine levels and MTHFR 677 C>T genotyping in South African patients diagnosed with depression: test development for clinical application[J]. Metab Brain Dis, 2014, 29(2): 377 – 384
- Zappacosta B, Graziano M, Persichilli S, *et al.* 5,10 – Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms: genotype frequency and association with homocysteine and folate levels in middle – southern Italian adults[J]. Cell Biochem Function, 2014, 32(1): 1 – 4
- 中华医学会神经病学分会. 中国缺血性脑血管病血管内介入诊疗指南 2015[J]. 中华神经科杂志, 2015, 48(10): 187 – 189
- Association AD. Executive summary: standards of medical care in diabetes – 2014. [J]. Diabetes Care, 2014, 28(Suppl 12): 4 – 36
- Chmurzynska A, Malinowska AM, Twardowska – Rajewska J, *et al.*

Elderly women: Homocysteine reduction by short – term folic acid supplementation resulting in increased glucose concentrations and affecting lipid metabolism (C677T MTHFR polymorphism) [J]. Nutrition, 2013, 29(6): 841 – 844

- Sasao H, Fujiwara H, Murai H, *et al.* Does motor dysfunction after cerebral infarction impede the development of angina symptoms? A comparison of coronary angiographic findings in patients with and without prior cerebral infarction. [J]. Int Heart J, 2013, 54(1): 1 – 6
- 王年臻, 余丹. 同型半胱氨酸及其代谢酶基因多态性与缺血性脑卒中的相关性研究进展[J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2016, (1): 105 – 109
- 张萌, 郑慧, 张敏, 等. 颈动脉不稳定型斑块、血脂、血压与急性脑梗死关系的病例对照研究[J]. 中华疾病控制杂志, 2016, 15(8): 831 – 834
- Mecully. Homocysteine theory of arteriosclerosis[J]. Atherosclerosis, 1975, 22(15): 215 – 227
- 马亮, 刘倩, 丛笑, 等. 糖尿病与非糖尿病性脑梗死患者 MTHFR 基因多态性 C677T 与同型半胱氨酸水平相关性研究[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(3): 205 – 209
- 胡中文. 脑动脉粥样硬化性狭窄与血清同型半胱氨酸和亚甲基四氢叶酸还原酶 C677T 基因多态性研究[D]. 蚌埠: 蚌埠医学院, 2015
- 贺颖, 连建华, 齐华, 等. 深静脉血栓形成患者 MTHFR/C677T 基因多态性检测[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2004, 39(1): 91 – 93
- 常敏强, 王晓丹. 突发性耳聋患者血浆同型半胱氨酸及血液流变学指标的变化及意义[J]. 医学研究杂志, 2014, 43(9): 119 – 121
- Zhang B, Gao C, Hou Q, *et al.* The potent different risk factors for cerebral infarction in young patients with and without type 2 diabetes: Subanalysis of the Young Cerebral Infarction Study (YCIS) [J]. Atherosclerosis, 2012, 221(1): 215 – 220

(收稿日期: 2016 – 08 – 30)

(修回日期: 2016 – 10 – 06)

(上接第 27 页)

- Ilkun O, Boudina S. Cardiac dysfunction and oxidative stress in the metabolic syndrome: an update on antioxidant therapies [J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(27): 4806 – 4817
- Fauconnier J, Andersson DC, Zhang SJ, *et al.* Effects of palmitate on Ca^{2+} handling in adult control and ob/ob cardiomyocytes: impact of mitochondrial reactive oxygen species [J]. Diabetes, 2007, 56(4): 1136 – 1142
- Bugger H, Abel ED. Molecular mechanisms for myocardial mitochondrial dysfunction in the metabolic syndrome [J]. Clin Sci: Lond, 2008, 114(3): 195 – 210
- Neves FA, Cortez E, Bernardo AF, *et al.* Heart energy metabolism impairment in Western – diet induced obese mice [J]. J Nutr Biochem, 2014, 25(1): 50 – 57
- 张逸杰, 戴明彦, 曹权, 等. 一种不依赖呼吸机的小鼠心肌内注射技术的建立 [J]. 医学研究杂志, 2015, 45(4): 32 – 36
- Shen X, Zheng S, Metreveli NS, *et al.* Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy

[J]. Diabetes, 2006, 55(3): 798 – 805

- Domeier TL, Roberts CJ, Gibson AK, *et al.* Dantrolene suppresses spontaneous Ca^{2+} release without altering excitation – contraction coupling in cardiomyocytes of aged mice [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014, 307(6): H818 – 829
- 李小鹰. 肌浆网钙 ATP 酶 2a 基因转导治疗心力衰竭的研究 [J]. 中华心血管病杂志, 2005, 33(6): 576 – 578
- Aguer C, Mercier J, Man CY, *et al.* Intramyocellular lipid accumulation is associated with permanent relocation ex vivo and in vitro of fatty acid translocase (FAT)/CD36 in obese patients [J]. Diabetologia, 2010, 53(6): 1151 – 1163
- Liu ZW, Zhu HT, Chen KL, *et al.* Protein kinase RNA – like endoplasmic reticulum kinase (PERK) signaling pathway plays a major role in reactive oxygen species (ROS) – mediated endoplasmic reticulum stress – induced apoptosis in diabetic cardiomyopathy [J]. Cardiovasc Diabetol, 2013, 12: 158

(收稿日期: 2016 – 10 – 11)

(修回日期: 2016 – 10 – 20)