

干扰 CD36 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

张逸杰 夏 巍 戴明彦 曹 权 何文博 包明威

摘 要 **目的** 研究干扰心肌组织中脂肪酸转位酶 CD36 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 - CD36),采用高脂饮食诱导肥胖。6 周龄时,经心肌注射靶向 CD36(O - CD36)或靶向无关基因(N - mock、O - mock)的重组慢病毒,以下调心肌组织中目标基因的表达。16 周龄时,取小鼠左心室组织,检测 CD36 和肌质网钙泵(SERCA2a)的 mRNA 和蛋白表达;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 CD36 的表达较正常小鼠无显著改变,慢病毒介导的 RNA 干扰显著下调了 CD36 的表达。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 CD36 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 CD36 的表达可改善肥胖所引起的心肌细胞钙调控异常。

关键词 肥胖小鼠 CD36 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.2017.11.011

Effects of Cardiospecific CD36 Suppression on Myocardial Calcium Handling in High - Fat - Diet Induced Obese Mice. Zhang Yijie, Xia Wei, Dai Mingyan, 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 cardiospecific CD36 suppression on myocardial calcium handling in high - fat - diet (HFD) induced obese mice. **Methods** Four weeks aged male C57 mice were randomized into normal control group (N - mock), obese control group (O - mock) and obese intervention group (O - CD36). HFD was used to induce obesity in this research. At six weeks of age, mice were subjected to intramyocardial injection with recombinant lentivirus targeting murine CD36 (for O - CD36) or irrelevant gene (for N - mock and O - mock) to down - regulate their expressions. When mice reached 16 weeks of age, left ventricular tissues were obtained. The mRNA and protein expressions of CD36 and sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} - ATPase 2a (SERCA2a) were detected by RT - PCR and 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 levels of myocardial CD36 were not influenced by HFD feeding. Lentivirus - mediated RNAi significantly down - regulated cardiac CD36 expression. Obesity decreased myocardial SERCA2a expression, reduced calcium transient velocity, and damaged calcium handling as well. Cardiospecific CD36 inhibition ameliorated the myocardial SERCA2a deficiency. Meanwhile, the calcium mishandling was improved. **Conclusion** Cardiospecific CD36 suppression ameliorated myocardial calcium mishandling associated with HFD induced obesity.

Key words Obese mice; CD36; RNA interference; Calcium mishandling; SERCA2a

肥胖是当今全球面临的严重健康问题,其发生率在全球均呈上升趋势。当前,全球约有 5 亿肥胖症(体重指数 $> 30\text{kg}/\text{m}^2$)患者^[1]。中国肥胖人群的绝

对数量已超过美国,居世界第 1 位^[2]。肥胖与心血管疾病的发生密切相关,可导致心血管疾病的发病年龄提前,影响药物及非药物的治疗效果,并增加心血管疾病的病死率^[3]。

大量的临床观察提示,肥胖患者即使无其他心血管病危险因素其心脏也可出现重构,表现为心肌肥厚、心脏舒缩异常功能等,最终可进展为心力衰竭^[4-6]。动物研究表明,高脂饮食诱导的肥胖可引起心肌脂肪酸(fatty acids, FA)代谢紊乱,促进心肌内

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);湖北省卫生和计划生育委员会科研基金资助项目(WJ2017Z003)

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

有害脂质蓄积,增加毒性代谢副产物活性氧簇的含量,最终导致心肌细胞钙调控异常^[7]。钙调控是心肌细胞兴奋-收缩耦联的关键环节,其异常可促进心脏重构的发生^[8]。因此,干扰肥胖状态下心肌细胞 FA 代谢,可能成为治疗肥胖性心脏重构的有效手段。

生理状态下,心肌细胞主要通过 FA 的 β 氧化及葡萄糖的有氧氧化供能。肥胖时,心肌细胞利用葡萄糖受阻,从而更加依赖 FA 的 β 氧化供能^[9]。心肌细胞能量代谢谱的改变使得毒性代谢中间产物生成增多,超出细胞的清除能力而损伤肌质网^[10]。后者是心肌细胞内钙离子(Ca^{2+})储存的主要场所,其功能受损可引起胞内 Ca^{2+} 代谢障碍^[11]。 β 氧化的增加还导致氧化磷酸化解偶联,线粒体 ATP 生成效率下降,肌质网钙泵(sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2a, SERCA2a)的活性减低,加剧钙调控异常^[12]。

CD36 又名脂肪酸转位酶,是 FA 分解代谢过程中的限速酶,分布于细胞膜及胞质中。位于胞膜上的 CD36 主要介导 FA 转运入胞。肥胖时,分布于胞质的 CD36 可移位至细胞膜,介导摄取更多的 FA 参与 β 氧化^[13]。笔者假设下调 CD36 的表达可通过降低

FA 高代谢率而改善钙调控异常。为验证该假设,笔者构建了靶向 CD36 的慢病毒,通过 RNA 干扰下调肥胖小鼠心肌细胞 CD36 的表达,研究此干预对钙调控的影响。

材料与方法

1. 实验动物及研究方案:SPF 级雄性 4 周龄 C57 小鼠,体重 $17.51 \pm 0.37\text{g}$,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-CD36),饲养于武汉大学人民医院动物实验中心。环境温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$,湿度 45%~50%,光照/黑暗比 12h/12h。所有操作严格遵循实验动物使用的“3R 原则”。其中,N-mock 给予正常饮食(D12450B,含 10% 脂肪、20% 蛋白及 70% 的糖),O-mock、O-CD36 给予高脂饮食(D12492,含 60% 脂肪、20% 蛋白及 20% 的糖)诱导肥胖。小鼠及饲料均购自北京华阜康生物公司。6 周龄时,O-CD36 经心肌注射靶向 CD36 的重组慢病毒,N-mock、O-mock 经心肌注射靶向绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)的重组慢病毒,以下调目标基因的表达。16 周龄时取材检测(图 1)。

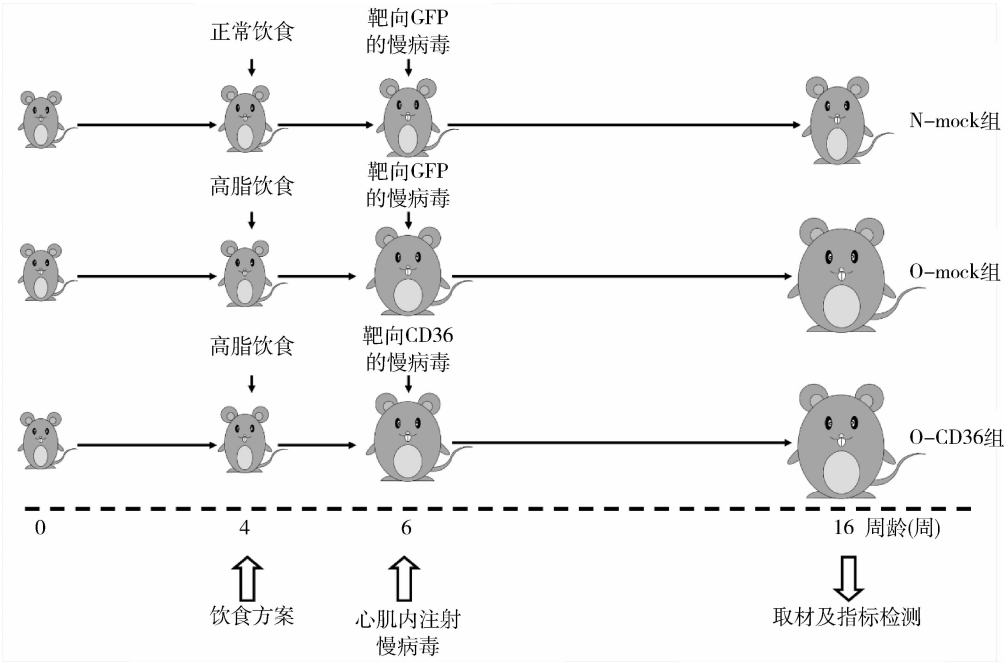


图 1 研究方案

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 周龄时取材完成指标检测

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)、活细胞工作站(AF6000,德国 Leica 公司)、超高速相机(DFC550,德

国 Leica 公司)、倒置显微镜(DMI6000B,德国 Leica 公司)、恒流泵(LEAD-2,英国 Longer 公司)等。主要试剂包括 II 型胶原酶(C6885-1G,美国 Sigma-

Aldrich 公司)、Fluo-4, AM (F14201, 美国 Thermo Fisher 公司)、反转录试剂盒 (FSQ-101, 上海东洋生物科技有限公司)、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)、CD36 一抗 (sc-9154, 美国 Santa Cruz 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)。

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 CD36 作为 RNA 干扰的目标基因, 另选取无关基因 GFP 作为对照。构建靶向小鼠 CD36 (5'-CCG GCA GTC GGA GAC ATG CTT ATC TCG AGA TAA GCA TGT CTC CGA CTG 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: 心肌注射参照本课题组既往已建立的方法学^[14]。麻醉小鼠后, 于胸前区沿左锁骨中线做一长约 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。

5. 实时荧光定量 RT-PCR: 使用 TRIzol 法提取心室组织总 RNA, 并合成 cDNA, 再按 SYBR Green 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: CD36 正向引物: 5'-AGC AAC TGG TGG ATG GTT TC-3', 反向引物: 5'-TCA AGG GAG AGC ACT GGT TT-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: 使用 RIPA 裂解液从心室组织中提取总蛋白, BCA 法蛋白定量, 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 CD36 1:200, 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: 取小鼠腹腔依次注射肝素 (5U/g 体重) 和戊巴比妥钠 (90 μ g/g 体重), 麻醉后开胸, 完整剪取心脏, 经主动脉插管逆行灌注。使用氧合的含 II 型胶原酶

(0.33mg/ml) 的无钙台氏液消化 8~10min 至心脏疏松变软。剪下左心室置于无钙台氏液内终止消化, 充分剪碎, 使用吸管轻柔吹散细胞, 再经 100 目的筛网过滤, 得到单个分散的心室肌细胞^[15]。在 40min 内梯度复钙至 Ca^{2+} 浓度 0.4mmol/L。将单细胞悬液离心, 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。使用含阴离子转运体抑制剂 Sulfonpyrazone (0.1 μ mol/L) 的正钙台式液离心、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^[16]。

向活细胞工作站灌注槽中加入 1ml 稀释后的上述细胞悬液。待细胞贴壁, 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, 通过固定在灌注槽两端的铂金丝, 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 494nm/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 统计学软件进行统计分析, 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 Student-Newman-Keuls 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: 16 周龄时, 高脂饮食小鼠的体重较正常饮食小鼠显著增加 (O-mock 34.56 $\pm$ 1.06g vs N-mock 28.82 $\pm$ 0.98g, $P = 0.000$)。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-CD36 35.36 $\pm$ 1.02g vs O-mock 34.56 $\pm$ 1.06g, $P > 0.05$), 如图 2 所示。

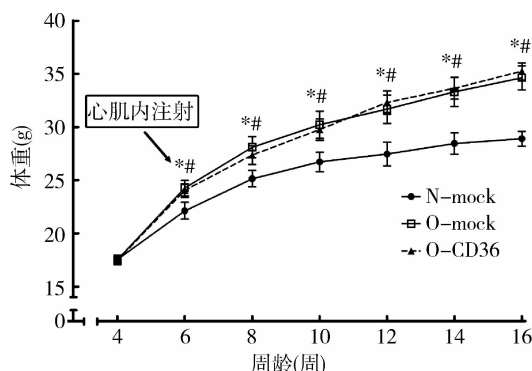


图 2 小鼠体重变化

图示不同饮食方案对小鼠体重的影响 (每组 $n = 10$)。N-mock 与 O-mock 比较, * $P = 0.000$; N-mock 与 O-CD36 比较, # $P = 0.000$

2. 慢病毒介导的 RNA 干扰下调了心肌 CD36 的表达:RT-PCR 结果提示,肥胖对心肌 CD36 的 mRNA 表达的影响差异无统计学意义($O - mock\ 1.11 \pm 0.17$ vs $N - mock\ 1.00 \pm 0.13$, $P > 0.05$),慢病毒介导的 RNA 干扰显著减少了心肌组织约 50% ($O - CD36\ 0.54 \pm 0.15$ vs $O - mock\ 1.11 \pm 0.17$, $P <$

0.05) 的 CD36 的 mRNA 表达(图 3 中 A)。Western blot 法结果与之一致,肥胖对 CD36 的蛋白表达无显著影响($O - mock\ 1.07 \pm 0.11$ vs $N - mock\ 1.00 \pm 0.10$, $P > 0.05$),RNA 干扰下调了肥胖小鼠心肌中 53% ($O - CD36\ 0.51 \pm 0.14$ vs $O - mock\ 1.07 \pm 0.11$, $P < 0.05$) 的 CD36 的蛋白表达(图 3 中 B、C)。

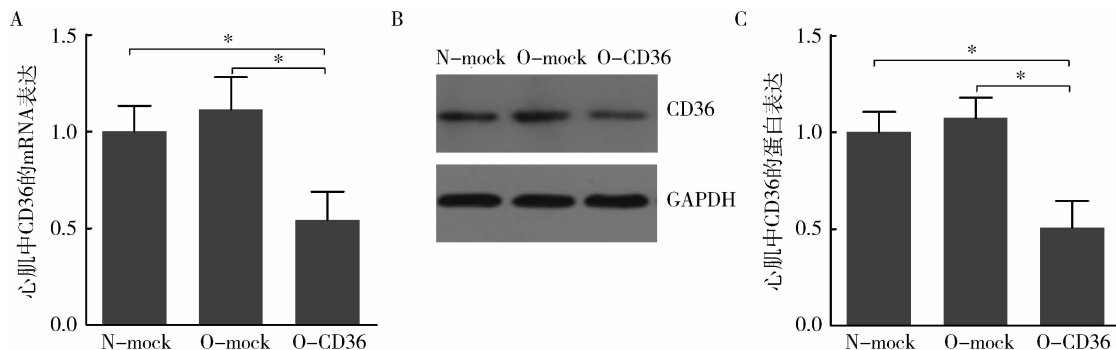


图 3 心肌组织中 CD36 的 mRNA 和蛋白表达

A. 实时荧光定量 RT-PCR 提示,高脂饮食对小鼠心肌组织 CD36 的 mRNA 表达的影响差异无统计学意义,心肌内注射慢病毒显著下调了肥胖小鼠 CD36 的 mRNA 表达(每组 $n = 3$);B. Western blot 法的检测结果图片,以 GAPDH 作为内参;C. 蛋白定量的结果提示,肥胖对心肌细胞 CD36 的蛋白表达无显著影响,RNA 干扰显著降低 O-CD36 小鼠心肌 CD36 的蛋白表达(每组 $n = 3$);* $P < 0.05$

3. 下调 CD36 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肌质网对 Ca^{2+} 的摄取障碍。经 12 周的饮食干预,肥胖小鼠心肌组织中 SERCA2a 的 mRNA 表达显著降低($O - mock\ 0.74 \pm 0.11$ vs $N - mock\ 1.00 \pm 0.11$, $P < 0.05$),下调 CD36 的表达增加了 SERCA2a 的 mRNA 表达($O - CD36\ 1.05 \pm 0.15$ vs

$O - mock\ 0.74 \pm 0.11$, $P < 0.05$) 至正常水平(图 3A)。Western blot 法的结果提示,O-mock 小鼠心肌组织中 SERCA2a 的蛋白表达较 N-mock 小鼠减少约 40% ($O - mock\ 0.59 \pm 0.15$ vs $N - mock\ 1.00 \pm 0.16$, $P < 0.05$);下调 CD36 的表达显著增加了心肌 SERCA2a 的蛋白表达($O - CD36\ 1.12 \pm 0.11$ vs $O - mock\ 0.59 \pm 0.15$, $P < 0.05$;图 4)。

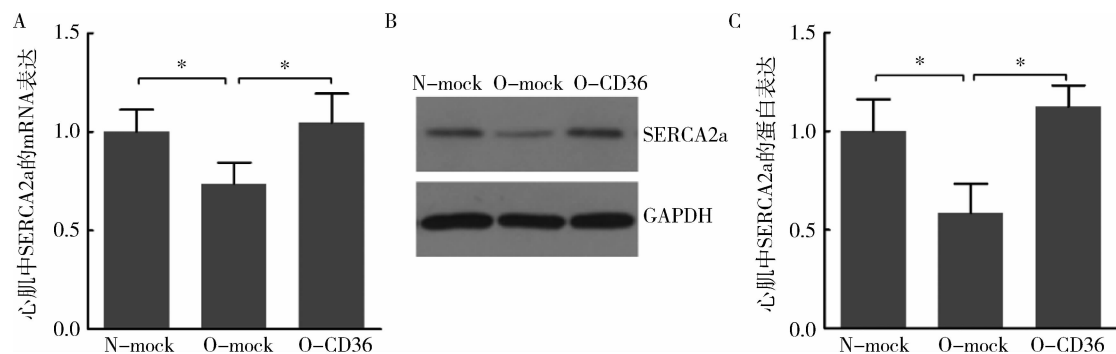


图 4 心肌组织中 SERCA2a 的 mRNA 和蛋白表达

A. 实时荧光定量 RT-PCR 提示,肥胖引起小鼠心肌组织 SERCA2a 的 mRNA 表达显著降低,下调 CD36 的表达增加 SERCA2a 的 mRNA 表达至正常水平(每组 $n = 3$);B. Western blot 法检测凝胶图像,以 GAPDH 作为内参;C. 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 CD36 的表达逆转了肥胖所导致的 SERCA2a 减少(每组 $n = 3$);* $P < 0.05$

4. 下调 CD36 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,与心肌细胞的舒缩功能密切相关^[16]。笔者使用频率分别为

0.5Hz 和 1.0Hz 的场刺激诱发心肌细胞钙瞬变(图 5 中 A ~ C),结果提示,O-mock 小鼠的钙瞬变幅度较 N-mock 小鼠显著减低(0.5Hz 场刺激时 $O - mock\ 2.02 \pm 0.27$ vs $N - mock\ 2.64 \pm 0.29$, $P < 0.05$;

1.0Hz 场刺激时 O - mock 1.87 ± 0.19 vs N - mock 2.32 ± 0.27 , $P < 0.05$), 下调 CD36 的表达逆转了上述改变(0.5Hz 场刺激时 O - CD36 2.82 ± 0.28 vs O - mock 2.02 ± 0.27 , $P < 0.05$; 1.0Hz 场刺激时 O - CD36 2.41 ± 0.19 vs O - mock 1.87 ± 0.19 , $P < 0.05$; 图 5 中 D、G)。高脂饮食诱导肥胖引起心肌细胞钙瞬变速率显著下降(0.5Hz 场刺激时 O - mock 20.43 ± 2.00 vs N - mock 27.58 ± 2.26 , $P < 0.05$; 1.0Hz 场刺激时 O - mock 22.64 ± 2.50 vs N - mock 28.14 ± 2.14 , $P < 0.05$), 下调 CD36 的表达改善了肥胖导致的钙瞬变速率异常(0.5Hz 场刺激时 O - CD36 26.60 ± 2.09 vs O - mock 20.43 ± 2.00 , $P <$

0.05; 1.0Hz 场刺激时 O - CD36 30.01 ± 2.86 vs O - mock 22.64 ± 2.50 , $P < 0.05$; 图 5E、H)。高脂饮食小鼠的 $T_{50\%}$ 较正常饮食小鼠显著延长(0.5Hz 场刺激时 O - mock 492.95 ± 30.67 ms vs N - mock 414.66 ± 24.61 ms, $P < 0.05$; 1.0Hz 场刺激时 O - mock 378.62 ± 23.00 ms vs N - mock 312.35 ± 21.64 ms, $P < 0.05$), 下调 CD36 的表达缩短 $T_{50\%}$ 至正常水平(0.5Hz 场刺激时 O - CD36 422.25 ± 30.62 ms vs O - mock 492.95 ± 30.67 ms, $P < 0.05$; 1.0Hz 场刺激时 O - CD36 326.24 ± 24.27 ms vs O - mock 378.62 ± 23.00 ms, $P < 0.05$; 图 5 中 F、I)。

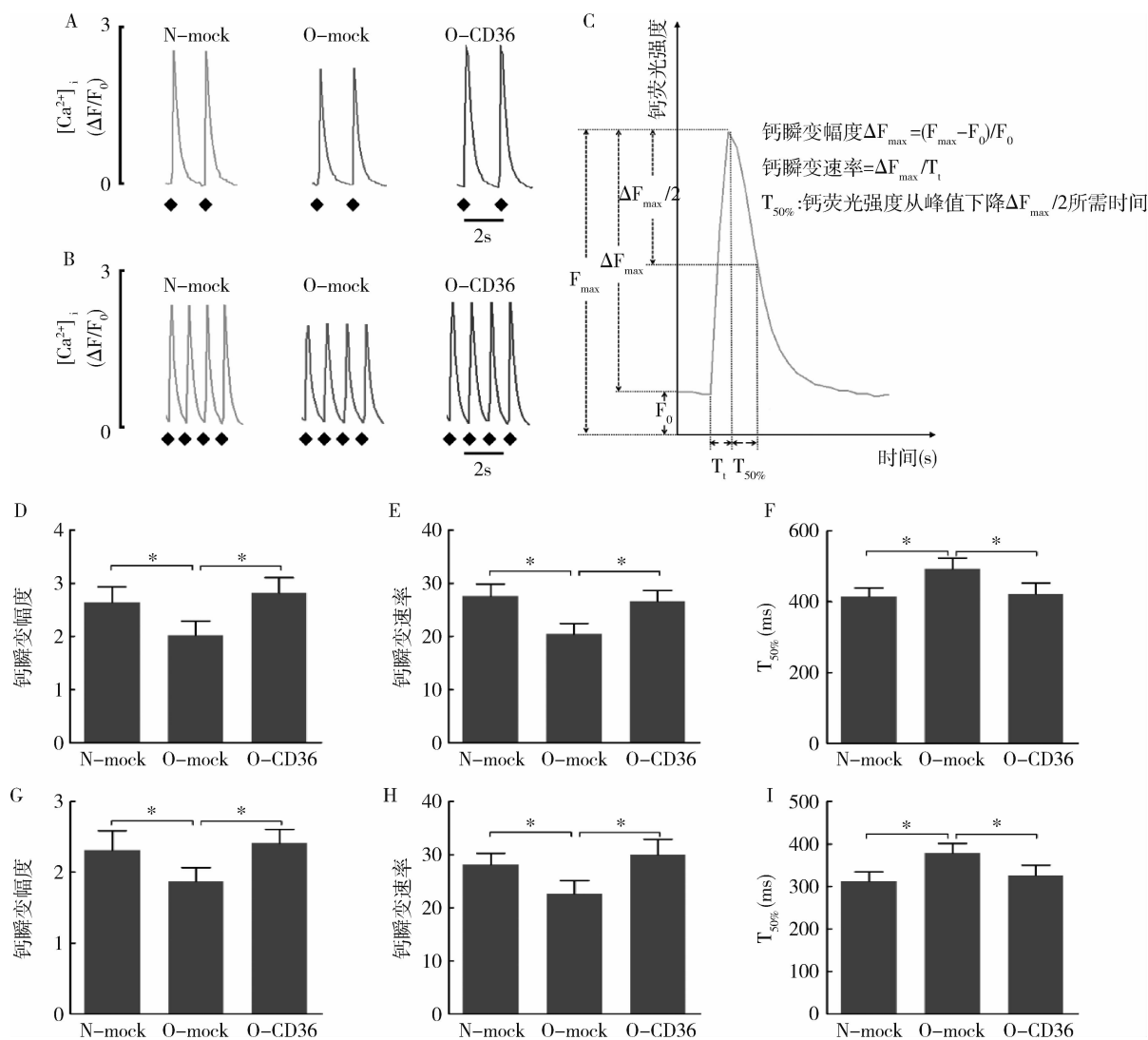


图 5 心肌细胞钙瞬变

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 (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 $n = 4 \sim 5$, 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 $n = 4 \sim 5$, 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_i , 钙瞬变时间; $T_{50\%}$, 钙瞬变半恢复时间; * $P < 0.05$

讨 论

肌质网摄取和释放 Ca^{2+} 的能力是心肌细胞舒张和收缩的关键因素。参与心肌细胞动作电位的 Ca^{2+} 约 90% 来自肌质网腔, 仅 10% 来自细胞外。肌质网依赖多种蛋白参与心肌细胞钙调控, SERCA2a 是其中最重要的一种蛋白。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, 使心肌细胞产生舒缩活动。在收缩期, 膜电位去极化激活 L 型钙通道, 使少量 Ca^{2+} 入胞, 激活肌质网 Ryanodine 受体 2 通道, 释放大量的 Ca^{2+} 到胞质, 引起心肌细胞收缩; 在舒张期, SERCA2a 将胞质内 Ca^{2+} 重新泵回肌质网, 同时细胞膜上的钠 - 钙交换体将 Ca^{2+} 转运至胞外, 胞质内 Ca^{2+} 浓度随之降低, 心肌细胞舒张。SERCA2a 数量的下调和效率的降低均损害心肌细胞钙调控, 导致肌质网钙储备减少和胞质内钙超载^[8], 影响心肌细胞舒缩功能。

病理性肥胖时, 外周血中 FA 水平显著升高, 诱使原本分布于心肌细胞质的 CD36 转移至胞膜, 介导大量 FA 摄取入胞^[13], 并以中性脂质 (主要是甘油三酯) 的形式沉积于胞质, 导致心肌细胞脂毒性。而分布于线粒体外膜的肉毒碱脂酰转移酶 - 1b 表达上调, 则介导更多的 FA 从胞质进入线粒体参与 β 氧化^[17]。上述病理改变导致心肌细胞内 FA 的 β 氧化率显著增加, 其代谢中间产物活性氧自由基亦显著增多, 当其含量超出细胞的清除能力时, 可引起内质网应激^[18]。肌质网是心肌细胞内特化的内质网, 在钙调控中起关键作用, 其损伤必然导致钙调控异常。本课题组的前期研究证实, 下调 CD36 的表达可改善肥胖小鼠心肌组织内中性脂质的蓄积, 并显著抑制活性氧自由基的生成^[19]。因此, 通过下调 CD36 的表达来改善肥胖所导致的钙调控异常, 有其理论基础。

病理性肥胖者通常首先出现左心室舒张功能障碍, 其可能机制包括: (1) 心肌细胞过度依赖 FA 的 β 氧化供能, 在氧供一定的情况下, 消耗单位氧分子生成 ATP 的效率低于葡萄糖有氧化。由于 Ca^{2+} 回摄是主动耗能的过程, ATP 相对缺乏引起 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。(2) β 氧化产生的大量活性氧自由基引起线粒体氧化磷酸化解偶联, ATP 生成效率将进一步降低, 加剧上述效应^[12]。(3) 氧自由基损伤肌质网, 引起 SERCA2a 的表达减少, 恶化 Ca^{2+} 回摄障碍。(4) 大量的毒性脂质

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^[9]。

本研究结果证实, 肥胖小鼠心肌细胞的钙瞬变幅度显著降低 (图 5 中 D、G), 钙瞬变速率的显著下降 (图 5 中 E、H), 推测是由于 SERCA2a 的表达和活性降低, 使得肌质网在舒张期摄取 Ca^{2+} 的能力下降, 导致胞质内钙超载; 在收缩期, 肌质网释放 Ca^{2+} 相应减少, 引起钙瞬变的幅度和速率减低, 通过兴奋 - 收缩偶联引起心肌收缩功能下降。上述机制在肥胖性心脏重构中起重要作用。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对 Ca^{2+} 的回摄功能。通过下调心肌 CD36 的表达, 上述钙调控异常得到显著改善。

结合前期研究基础及本研究的结果, 笔者推测, 定向下调 CD36 的表达可改善肥胖小鼠心肌中活性氧自由基的过度生成, 从来源上抑制后者对肌质网 Ca^{2+} 调节蛋白的损伤 (图 4), 从而改善心肌细胞钙调控异常 (图 5)^[19]。

综上所述, CD36 在肥胖所致的心肌细胞钙调控异常中起重要作用, 干预脂代谢的关键酶可能成为治疗代谢性心脏重构的有效手段。

参考文献

- 1 Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, *et al.* The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments [J]. *Lancet*, 2011, 378(9793):804 - 814
- 2 T Lancet. Obesity: a growing threat to health in China [J]. *Lancet*, 2014, 384(9945):716
- 3 Prospective Studies C, Whitlock G, Lewington S, *et al.* Body - mass index and cause - specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies [J]. *Lancet*, 2009, 373(9669):1083 - 1096
- 4 Sanchez AA, Singh GK. Early ventricular remodeling and dysfunction in obese children and adolescents [J]. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*, 2014, 16(10):340
- 5 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
- 6 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

(下转第 96 页)

冠脉病变进展也起着重要影响作用。有研究表明,冠脉病变支数是影响冠心病患者预后的高危因素。

ROC 曲线分析显示, TG、LDL - C 及冠脉病变数 ≥ 2 预测 ICS - PLAD 患者发生 MACE 的 ROC 曲线下面积分别为 0.637、0.591、0.667, 而综合以上 3 项危险因素建立的危险因素模型预测 ICS - PLAD 患者发生 MACE 的 ROC 曲线下面积为 0.794, 当预测概率 (P) 最佳临界值为 0.252 时, 危险因素模型预测 MACE 的敏感度和特异性分别为 75.9%、72.5%, 其预测效能明显好于单一危险因素。由此表明, 单个危险因素评估 ICS - PLAD 患者发生 MACE 的能力有限, 用多个危险因素组成的危险因素模型综合分析可以提高预测的正确性。

综上所述, 危险因素模型对 ICS - PLAD 患者发生 MACE 具有一定的预测价值, 对筛选高危 ICS - PLAD 患者具有一定的临床价值, 对 ICS - PLAD 患者治疗策略的选择具有一定指导作用。

参考文献

- 1 Manoharan G, Ntalianis A, Muller O, *et al.* Severity of coronary arterial stenoses responsible for acute coronary syndromes [J]. *Am J Cardiol*, 2009, 103:1183 - 1188
- 2 刘传芬, 王伟民, 刘健, 等. 血管内超声在冠状动脉临界病变诊断和介入治疗中的应用[J]. *中国循环杂志*, 2011, 26: 15 - 18
- 3 De Araújo Gonçalves P, Brito J, Sousa PJ, *et al.* Nonobstructive coronary disease leading to STEMI: assessment of residual stenosis after thrombus aspiration [J]. *Coron Artery Dis*, 2013, 24:154 - 159
- 4 中华医学会心血管病学分会介入心脏病学组, 中国医师协会心血

管内科医师分会血栓防治专业委员会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 中国经皮冠状动脉介入治疗指南(2016) [J]. *中华心血管病杂志*, 2016, 44(5):382 - 400

- 5 Schoenhagen P, McErlean ES. The vulnerable coronary plaque [J]. *J Cardiovasc Nurs*, 2000, 15:1 - 12
- 6 Badimon L, Badimon JJ, Vilahur G, *et al.* Pathogenesis of the acute coronary syndromes and therapeutic implications [J]. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2002, 32:225 - 231
- 7 Dickson BC. Towards understanding acute destabilization of vulnerable atherosclerotic plaques [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2003, 12:237 - 248
- 8 Farb A, Burke AP, Kolodgie FD. Pathological mechanisms of fatal late coronary stent thrombosis in humans [J]. *Circulation*, 2003, 108:1701 - 1706
- 9 Kawasaki M, Sano K, Okubo M, *et al.* Volumetric quantitative analysis of tissue characteristics of coronary plaques after statin therapy using three - dimensional integrated backscatter intravascular ultrasound [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 45:1946 - 1953
- 10 Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, *et al.* Statin therapy, LDL cholesterol, C - reactive protein, and coronary artery disease [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352:29 - 38
- 11 Baigent C, Blackwell L, *et al.* Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta - analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials [J]. *Lancet*, 2010, 376:1670 - 1681
- 12 王森, 赵冬, 王薇, 等. 中国 35 ~ 64 岁人群血清甘油三酯与心血管病发病危险的关系[J]. *中华心血管病杂志*, 2008, 36: 940 - 943
- 13 中国成人血脂异常防治指南修订联合委员会. 中国成人血脂异常防治指南 2016 年修订版 [J]. *中华心血管病杂志*, 2016, 44(10):833 - 853

(收稿日期:2017 - 02 - 27)

(修回日期:2017 - 02 - 27)

(上接第 43 页)

- 7 Zhang Y, Fang X, Dai M, *et al.* Cardiac - specific down - regulation of carnitine palmitoyltransferase - 1b (CPT - 1b) prevents cardiac remodeling in obese mice [J]. *Obesity*: Silver Spring, 2016, 24(12): 2533 - 2543
- 8 Carvajal K, Balderas - Villalobos J, Bello - Sanchez MD, *et al.* Camishandling and cardiac dysfunction in obesity and insulin resistance: Role of oxidative stress [J]. *Cell Calcium*, 2014, 56(5):408 - 415
- 9 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
- 10 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
- 11 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
- 12 Bugger H, Abel ED. Molecular mechanisms for myocardial mitochondrial dysfunction in the metabolic syndrome [J]. *Clin Sci: Lond*, 2008, 114(3):195 - 210
- 13 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

- 14 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*, 2016, 45(4):32 - 36
- 15 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
- 16 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
- 17 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
- 18 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
- 19 张逸杰, 刘景, 戴明彦, 等. 下调心肌 CD36 的表达对肥胖小鼠心肌活性氧簇生成的影响 [J]. *医学研究杂志*, 2016, 45(8):46 - 51

(收稿日期:2017 - 04 - 17)

(修回日期:2017 - 04 - 19)