

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00576

• 研究简报 •

2型糖尿病大鼠心肌脂肪酸转运体 FAT/CD36 的表达变化及其对脂肪酸代谢的影响

Change of myocardium FAT/CD36 expression in rats with type 2 diabete and its influence on fatty acid metabolism

张治宇¹,倪海莱¹,赵彤¹,袁志忠²,殷仁富^{2*}

1. 第二军医大学上海军职以上退休干部休养所,上海 200433

2. 第二军医大学长征医院贵宾诊疗科,上海 200003

[关键词] 心肌;CD36 抗原;2型糖尿病;脂肪酸

[中图分类号] R 587.1

[文献标志码] B

[文章编号] 0258-879X(2010)05-0576-03

在心血管疾病的众多危险因素中,糖尿病日益受到人们的重视。糖尿病时高血糖、高胰岛素及血脂异常可加重冠状动脉硬化的程度,增高冠心病的发病率^[1],同时糖尿病亦是非缺血性心力衰竭的重要病因^[2]。既往大多数有关糖尿病性心力衰竭病理生理变化的基础研究主要集中于血流动力学、神经内分泌、细胞因子和信号转导等方面^[3-4],对于脂质代谢方面的研究较少。研究已证实糖尿病患者血浆脂质升高的同时,心肌内亦存在脂质蓄积,脂质蓄积可影响心肌对胰岛素的敏感性,使其对葡萄糖的利用能力下降,并可直接损伤心肌细胞,导致心肌细胞出现凋亡^[5]。新近研究发现在骨骼肌、心肌、脂肪等组织的细胞膜上存在一种参与长链脂肪酸(long chain fatty acid, LCFA)转运的蛋白^[6],命名为脂肪酸转运体(fatty acid translocase, FAT),后来发现与人类白细胞分化抗原 CD36 相同,故简称 FAT/CD36。同葡萄糖转运子相似,FAT/CD36 主要存在于心肌细胞膜和胞质内^[7]。关于 FAT/CD36 在脂质代谢异常时心肌脂质蓄积过程中的作用,目前未见相关报道。本研究观察了 2 型糖尿病大鼠心肌 FAT/CD36 的表达量及分布随病程的变化情况,探讨其在心肌脂质蓄积中的作用。

1 材料和方法

1.1 模型的制备与分组 4 周龄雄性 SD 大鼠 50 只,随机分为对照组(10 只)和高脂组(40 只),对照组大鼠给予普通饲料喂养;高脂组给予高脂饲料喂养。4 周后高脂组大鼠给予一次性腹腔注射链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司,溶于新鲜配制的 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液中,pH 4.2,浓度 1%) 30 mg/kg,继续给予高脂饲料喂养,1 周后测非禁食血糖,以非禁食血糖 ≥ 16 mmol/L 为判定 2 型糖尿病大鼠模型制备成功标准,成功者(3 只)按随机原则分为糖尿病 4 周组(DM_{4w}组, $n=10$)、糖尿病 8 周组(DM_{8w}组, $n=10$)、糖尿病 16 周组(DM_{16w}组, $n=10$)。

1.2 血清、心肌组织标本的留取 血清标本分别置于含

10% EDTA-2Na 30 μ l 和抑肽酶 40 μ l 的试管及空试管中,混匀后离心 10 min,分离血浆及血清标本后置-20℃ 冰箱保存待测。开胸游离鼠心脏,留取左室心尖部心肌 4~6 块,液氮中保存备用。

1.3 血清胰岛素、血糖、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)测定 采用中国原子能科学研究院¹²⁵I-胰岛素放射免疫分析试剂盒测定血清胰岛素,用大鼠标准品绘制标准曲线。用比色法检测血清 FFA,具体步骤按南京建成生物研究所的 FFA 试剂盒操作。用葡萄糖氧化酶法测血糖,酶比色法测 TC,酶法测 TG。

1.4 心肌组织 TG、FFA 含量测定 取 1 g 心室肌组织,加入组织裂解液,电动匀浆后取上层透明液体,采用酶比色法测定心肌组织 TG、FFA 含量。

1.5 胞质和胞膜蛋白的提取分离 心肌组织自液氮中取出并在玻璃平皿上剪碎,匀浆后采用超速离心法分离提取心肌胞质、胞膜蛋白,并采用 Bradford 方法进行蛋白定量。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测心肌组织 FAT/CD36 mRNA 水平 采用异硫氰酸胍-苯酚-氯仿一步法,按 TRIzol 试剂盒(Invitrogen 公司)说明提取心肌组织总 RNA,反转录合成 cDNA,然后进行实时荧光定量 PCR 反应,以 β -actin 作为内参照基因。引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成,FAT/CD36 (126 bp) sense: 5'- TCT TCC AGC CAA CGC CTT T -3', anti-sense: 5'- CCT TCT TTG CAC TTG CCA ATG TCC -3'; β -actin (265 bp) sense: 5'- ATG GTG GGT ATG GGT CAG AAG G-3', anti-sense: 5'-TGG CTG GGG TGT TGA AGG TC-3'。采用 SYBR Green dye I 实时定量 PCR 检测 FAT/CD36 mRNA 表达量。

1.7 蛋白免疫印迹法检测 FAT/CD36 水平 用蛋白免疫印迹法对 FAT/CD36 水平进行半定量分析,结果以目的条带与对照条带灰度值的比值来表示。

1.8 统计学处理 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

[收稿日期] 2009-09-24 [接受日期] 2010-04-10

[作者简介] 张治宇,博士,主治医师. E-mail: zhang1978zy@hotmail.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81885531, E-mail: yinrenfu28@sohu.com

2 结果

2.1 各组大鼠血清胰岛素、血糖、血脂及心肌组织 FFA、TG 含量比较

与对照组相比,DM_{4w}、DM_{8w}、DM_{16w} 3 组糖尿病

大鼠血糖、胰岛素、血脂水平及心肌组织 TG、FFA 含量明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);且随着病程的延长,程度逐渐加重(表 1)。

表 1 各组大鼠血清胰岛素、血糖、血脂水平及心肌组织 FFA、TG 含量的比较

($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	血清					心肌组织	
	胰岛素 $\mu\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$	血糖 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	TC $\rho_{\text{B}} / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	TG $\rho_{\text{B}} / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	FFA $\rho_{\text{B}} / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	TG (mg/g)	FFA (mg/g)
对照组	4.2±1.7	5.9±1.1	502±103	405±124	6 000±1 270	2.1±0.5	20.5±5.4
DM _{4w} 组	5.6±1.5*	14.7±1.3*	905±134*	753±147*	8 500±1 030*	2.9±0.8*	33.6±6.4*
DM _{8w} 组	7.8±2.3*	15.1±2.0*	1 225±143*△	1 052±135*△	11 500±2 100*△	3.5±0.7*△	40.8±8.6*△
DM _{16w} 组	8.3±1.8*△	16.9±1.6*	1 640±165*▲	1 450±162*▲	16 500±1 790*▲	4.0±0.6*▲	56.4±7.3*▲

TC:总胆固醇; TG:三酰甘油; FFA:游离脂肪酸。* $P < 0.05$ 与对照组比较;△ $P < 0.05$ 与 DM_{4w}组比较;▲ $P < 0.05$ 与 DM_{8w}组比较

2.2 各组大鼠心肌组织 FAT/CD36 mRNA和心肌细胞膜、细胞质 FAT/CD36 蛋白表达量的比较 以对照组为 1, DM_{4w}、DM_{8w}、DM_{16w} 3 组糖尿病大鼠心肌 FAT/CD36 mRNA表达量分别为 1.2±0.1、1.17±0.15、1.24±0.13,虽有不同程度升高,但与对照组相比差异无统计学意义。与对照组相比,DM_{4w}、DM_{8w}、DM_{16w} 组大鼠心肌细胞膜 FAT/CD36 蛋白表达量明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$),但 DM_{4w}、DM_{8w}、DM_{16w} 3 组间比较差异无统计学意义(图 1A);与对照组相比,DM_{4w}、DM_{8w}、DM_{16w} 3 组大鼠心肌细胞质 FAT/CD36 蛋白表达量无统计学差异(图 1B)。

糖脂代谢紊乱逐渐加重,并伴有心肌脂质蓄积。脂肪酸和葡萄糖作为成年心肌细胞有氧代谢产生 ATP 的主要底物,生理条件下二者维持相对的平衡。脂肪酸作为能量来源不如葡萄糖有效,需要多消耗 10% 的氧才能产生等量 ATP,使心肌效率(心脏做功/氧耗)下降;当病理因素导致心肌对糖脂利用失衡,将导致心肌细胞结构、功能受损,心肌收缩力下降。2 型糖尿病由于胰岛素抵抗的存在以及由此引起的循环 FFA 水平增高,可以造成心肌细胞对能量底物的利用改变,表现为葡萄糖氧化受损,而脂肪酸氧化增加,这一变化将带来高能磷酸盐的合成减少,这可能是糖尿病心肌病发生的重要基础,也是糖尿病发生缺血性心脏病预后较差的主要原因[8]。

FAT/CD36 在脂肪酸代谢活跃的组织中大量表达,例如心脏、脂肪、小肠,而在无利用脂肪酸能力的肝细胞中表达极低[9]。由于心肌的脂质储存能力有限,正常情况下大多数进入心肌细胞的脂肪酸被氧化,因此心肌对脂肪酸的摄取量是与其氧化能力相匹配的[10]。本研究发现糖尿病 4 周大鼠心肌细胞膜 FAT/CD36 表达量增加,心肌组织内脂质含量轻度增加,提示在糖尿病早期大鼠心肌长链脂肪酸摄取、利用增多。随着病程的延长,细胞膜 FAT/CD36 表达量无变化,心肌组织内脂质蓄积加重,提示在糖尿病后期虽能控制脂肪酸在线粒体氧化,但不能控制脂肪酸摄取,因此非氧化的脂肪酸可能在心肌细胞内蓄积而损伤细胞。本研究结果表明心肌内脂质蓄积是糖尿病大鼠心肌病变的重要特征,细胞膜 FAT/CD36 表达量增加可能在这一病理过程中具有重要作用,提示干预心肌脂质代谢过程可能成为预防糖尿病性心脏病的重要途径。

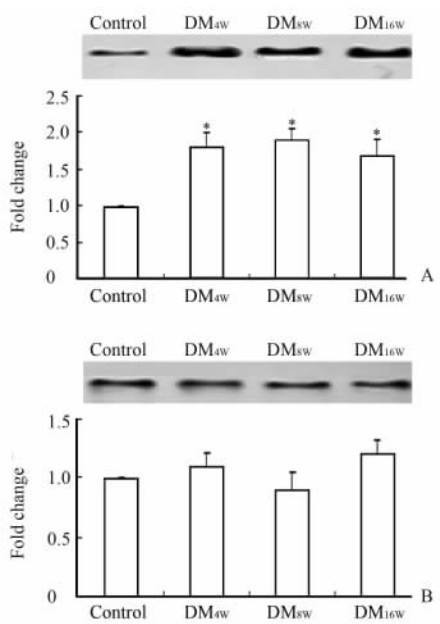


图 1 各组大鼠心肌细胞膜、脂质 FAT/CD36 蛋白表达量比较

A:细胞膜; B:细胞质。* $P < 0.05$ 与对照组比较。n=10, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

本研究采用高脂喂养结合腹腔注射小剂量 STZ 构建 2 型糖尿病大鼠模型,结果表明患病早期大鼠已出现高血糖、胰岛素抵抗、脂代谢紊乱等特点,且随着病程的延长,大鼠

【参考文献】

- [1] Yang Y K, Chen M, Clements R H, Abrams G A, Aprahamian C J, Harmon C M. Human mesenteric adipose tissue plays unique role versus subcutaneous and omental fat in obesity related diabetes[J]. Cell Physiol Biochem, 2008, 22(5-6): 531-538.
- [2] Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul C L, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological

- screening[J]. *Pharmacol Res*,2005,52:313-320.
- [3] Hajri T, Abumrad N A. Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology[J]. *Annu Rev Nutr*.2002,22:383-415.
- [4] Carley A N, Atkinson L L, Bonen A, Harper M E, Kunnathu S, Lopaschuk G D, et al. Mechanisms responsible for enhanced fatty acid utilization by perfused hearts from type 2 diabetic db/db mice[J]. *Arch Physiol Biochem*,2007,113:65-75.
- [5] Han X X, Chabowski A, Tandon N N, Calles-Escandon J, Glatz J F, Luiken J J, et al. Metabolic challenges reveal impaired fatty acid metabolism and translocation of FAT/CD36 but not FABPpm in obese Zucker rat muscle[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*,2007,293:E566-E575.
- [6] Cook G A, Edwards T L, Jansen M S, Bahouth S W, Wilcox H G, Park E A. Differential regulation of carnitine palmitoyltransferase- I gene isoforms (CPT- I alpha and CPT- I beta) in the rat heart[J]. *J Mol Cell Cardiol*,2001,33:317-329.
- [7] Holloway G P, Luiken J J, Glatz J F, Spriet L L, Bonen A. Contribution of FAT/CD36 to the regulation of skeletal muscle fatty acid oxidation: an overview[J]. *Acta Physiol (Oxf)*,2008,194:293-309.
- [8] Heilbronn L K, Gregersen S, Shirkhedkar D, Hu D, Campbell L V. Impaired fat oxidation after a single high-fat meal in insulin-sensitive nondiabetic individuals with a family history of type 2 diabetes[J]. *Diabetes*,2007,56:2046-2053.
- [9] Bonen A, Holloway G P, Tandon N N, Han X X, McFarlan J, Glatz J F, et al. Cardiac and skeletal muscle fatty acid transport and transporters and triacylglycerol and fatty acid oxidation in lean and Zucker diabetic fatty rats[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*,2009,297:R1202-R1212.
- [10] Carley A N, Severson D L. What are the biochemical mechanisms responsible for enhanced fatty acid utilization by perfused hearts from type 2 diabetic db/db mice[J]? *Cardiovasc Drugs Ther*.2008,22:83-89.

[本文编辑] 孙 岩