

SIRT6 通过下调 CD36 增加动脉粥样硬化斑块稳定性的机制研究



王婷婷, 李妍, 张明明, 蒋国健, 张东伟

【摘要】 **目的** 通过动物实验和细胞实验分析SIRT6增加动脉粥样硬化斑块稳定性的机制。**方法** 本实验时间为2019年12月至2021年12月。动物实验: 将10只雄性C57BL小鼠作为空白对照组; 将20只雄性ApoE^{-/-}小鼠随机分为动脉粥样硬化组和动脉粥样硬化+SIRT6 Tg组, 每组10只。采用高脂饲料喂养动脉粥样硬化组和动脉粥样硬化+SIRT6 Tg组小鼠16周以构建动脉粥样硬化小鼠模型。其中动脉粥样硬化+SIRT6 Tg组通过尾静脉注射200 μl滴度为1×10⁹ eg/ml的腺相关病毒(AAV)-SIRT6, 共注射3次, 在1周内完成注射, 以过表达SIRT6。干预16周后, 采用HE染色检测各组小鼠动脉粥样硬化斑块面积, Masson染色检测各组小鼠动脉粥样硬化斑块中胶原含量, 免疫组化染色检测各组小鼠动脉粥样硬化斑块中CD68表达水平。细胞实验: 取对数生长期的巨噬细胞, 将其分为空白对照组、氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)组(采用50 μg/ml的ox-LDL干预24 h)、ox-LDL+Ad-SIRT6组(转导腺病毒Ad-SIRT6 24 h, 用50 μg/ml的ox-LDL干预24 h); 采用Western blotting法检测各组巨噬细胞中SIRT6、CD36表达水平。取对数生长期的巨噬细胞, 将其分为空白对照组、ox-LDL组(采用50 μg/ml的ox-LDL干预24 h)、ox-LDL+Ad-SIRT6组(转导腺病毒Ad-SIRT6 24 h, 用50 μg/ml的ox-LDL干预24 h)、ox-LDL+Ad-SIRT6+Ad-CD36组(转导腺病毒Ad-SIRT6 24 h, 转导腺病毒Ad-CD36 24 h, 用50 μg/ml的ox-LDL干预24 h); 采用TUNEL染色检测各组巨噬细胞凋亡率。**结果** 动物实验: 空白对照组小鼠动脉粥样硬化斑块面积为0, 动脉粥样硬化组小鼠动脉粥样硬化斑块面积高于动脉粥样硬化+SIRT6 Tg组(P<0.05)。空白对照组小鼠动脉粥样硬化斑块中胶原含量为0, 动脉粥样硬化组小鼠动脉粥样硬化斑块中胶原含量低于动脉粥样硬化+SIRT6 Tg组(P<0.05)。空白对照组小鼠动脉粥样硬化斑块中CD68表达水平为0, 动脉粥样硬化组小鼠动脉粥样硬化斑块中CD68表达水平高于动脉粥样硬化+SIRT6 Tg组(P<0.05)。细胞实验: ox-LDL组、ox-LDL+Ad-SIRT6组巨噬细胞中SIRT6表达水平低于空白对照组, CD36表达水平高于空白对照组(P<0.05); ox-LDL+Ad-SIRT6组巨噬细胞中SIRT6表达水平高于ox-LDL组, CD36表达水平低于ox-LDL组(P<0.05)。ox-LDL组、ox-LDL+Ad-SIRT6组、ox-LDL+Ad-SIRT6+Ad-CD36组巨噬细胞凋亡率高于空白对照组, ox-LDL+Ad-SIRT6组、ox-LDL+Ad-SIRT6+Ad-CD36组巨噬细胞凋亡率低于ox-LDL组, ox-LDL+Ad-SIRT6+Ad-CD36组巨噬细胞凋亡率高于ox-LDL+Ad-SIRT6组(P<0.05)。**结论** SIRT6能够缩小ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块面积, 增加动脉粥样硬化斑块中胶原含量, 减少动脉粥样硬化斑块中巨噬细胞的浸润, 抑制巨噬细胞凋亡, 从而增加动脉粥样硬化斑块稳定性, 而这一作用是通过下调CD36的表达水平来实现的。

【关键词】 动脉粥样硬化; 斑块, 动脉粥样硬化; SIRT6; CD36; 巨噬细胞

【中图分类号】 R 543.5 **【文献标识码】** A DOI: 10.12114/j.issn.1008-5971.2022.00.080

王婷婷, 李妍, 张明明, 等.SIRT6通过下调CD36增加动脉粥样硬化斑块稳定性的机制研究[J].实用心脑血管病杂志, 2022, 30(4): 72-77. [www.syxnf.net]

WANG T T, LI Y, ZHANG M M, et al.Mechanism of SIRT6 increasing atherosclerotic plaque stability by downregulating CD36 [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2022, 30(4): 72-77.

Mechanism of SIRT6 Increasing Atherosclerotic Plaque Stability by Downregulating CD36 WANG Tingting, LI Yan, ZHANG Mingming, JIANG Guojian, ZHANG Dongwei

Department of Cardiology, Tangdu Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China

Corresponding author: ZHANG Dongwei, E-mail: zhdwu@163.com

【Abstract】 Objective To analyze the mechanism of SIRT6 increasing atherosclerotic plaque stability by animal experiment and cell experiment. **Methods** The experiment time was from December 2019 to December 2021. Animal experiment: 10 male C57BL mice were used as blank control group; 20 male ApoE^{-/-} mice were randomly divided into

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81900338)

710032陕西省西安市, 空军军医大学唐都医院心内科

通信作者: 张东伟, E-mail: zhdwu@163.com

atherosclerosis group and atherosclerosis+SIRT6 Tg group, 10 mice in each group. The mice in the atherosclerosis group and the atherosclerosis+SIRT6 Tg group were fed with high-fat diet for 16 weeks to establish atherosclerosis model. Among them, the atherosclerosis+SIRT6 Tg group was injected with 200 μ l of adeno-associated virus (AAV)-SIRT6 with a titer of 1×10^9 eg/ml through the tail vein for a total of 3 injections, and the injection was completed within 1 week to overexpress SIRT6. After 16 weeks of intervention, HE staining was used to detect the area of atherosclerotic plaque, Masson staining was used to detect the collagen content in the atherosclerotic plaque, and immunohistochemical staining was used to detect the expression level of CD68 in the atherosclerotic plaque of mice in each group. Cell experiment: the macrophages in the logarithmic growth phase were taken and divided into blank control group, oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) group (intervened with 50 μ g/ml ox-LDL for 24 h), ox-LDL+Ad-SIRT6 group (transduced adenovirus Ad-SIRT6 for 24 h, and intervened with 50 μ g/ml ox-LDL for 24 h); Western blotting was used to detect the expression levels of SIRT6 and CD36 in macrophages in each group. The macrophages in the logarithmic growth phase were taken and divided into blank control group, ox-LDL group (intervened with 50 μ g/ml ox-LDL for 24 h), ox-LDL+Ad-SIRT6 group (transduced adenovirus Ad-SIRT6 for 24 h, and intervened with 50 μ g/ml ox-LDL for 24 h), and ox-LDL+Ad-SIRT6+Ad-CD36 group (transduced adenovirus Ad-SIRT6 for 24 h, transduced adenovirus Ad-CD36 for 24 h, and intervened with 50 μ g/ml ox-LDL for 24 h); TUNEL staining was used to detect the apoptosis rate of macrophages in each group. **Results** Animal experiment: the area of atherosclerotic plaque in the blank control group was 0; the area of atherosclerotic plaque in the atherosclerosis group was higher than that in the atherosclerosis+SIRT6 Tg group ($P < 0.05$). The content of collagen in the atherosclerotic plaque in the blank control group was 0; the content of collagen in the atherosclerotic plaque in the atherosclerosis group was lower than that in the atherosclerosis+SIRT6 Tg group ($P < 0.05$). The level of CD68 expression in the atherosclerotic plaque in the control group was 0; the level of CD68 expression in the atherosclerotic plaque in the atherosclerosis group was higher than that in the atherosclerosis+SIRT6 Tg group ($P < 0.05$). Cell experiment: the level of SIRT6 expression in macrophages in the ox-LDL group and ox-LDL+Ad-SIRT6 group was lower than that in the blank control group, and the level of CD36 expression was higher than that in the blank control group ($P < 0.05$); the level of SIRT6 expression in macrophages in the ox-LDL+Ad-SIRT6 group was higher than that in the ox-LDL group, and the level of CD36 expression was lower than that in the ox-LDL group ($P < 0.05$). The apoptosis rate of macrophages in ox-LDL group, ox-LDL+Ad-SIRT6 group, ox-LDL+Ad-SIRT6+Ad-CD36 group was higher than that in blank control group ($P < 0.05$); the apoptosis rate of macrophages in ox-LDL+Ad-SIRT6 group and ox-LDL+Ad-SIRT6+Ad-CD36 group was lower than that in ox-LDL group ($P < 0.05$); the apoptosis rate of macrophages in ox-LDL+Ad-SIRT6+Ad-CD36 group was higher than that in ox-LDL+Ad-SIRT6 group ($P < 0.05$). **Conclusion** SIRT6 can reduce the area of atherosclerotic plaques in ApoE^{-/-} mice, increase the collagen content in atherosclerotic plaques, reduce the infiltration of macrophages in atherosclerotic plaques, and inhibit macrophages apoptosis, thereby increasing the stability of atherosclerotic plaques, and this effect is achieved by down-regulating the expression level of CD36.

【 Key words 】 Atherosclerosis; Plaque, atherosclerotic; SIRT6; CD36; Macrophages

急性心肌梗死在全球死因中居于首位,而不稳定动脉粥样硬化斑块是导致急性心肌梗死的重要诱因^[1]。不稳定动脉粥样硬化斑块的特点主要包括:大量的巨噬细胞演变成泡沫细胞并在斑块中不断聚集、斑块中炎症反应的不断加剧、脂质坏死核心面积的持续扩大,最终斑块破裂导致恶性心血管事件的发生^[2]。虽然大量研究表明,动脉粥样硬化的典型病理过程是大量吞噬氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)的泡沫细胞在内皮下不断聚集^[1],然而,如何有效抑制巨噬细胞对脂蛋白的摄取进而抑制泡沫细胞的形成尚不明确,因此,阐明泡沫细胞形成的病理机制、提出增加动脉粥样硬化斑块稳定性的干预策略,是目前心血管医生亟需解决的关键问题。

SIRT6主要在组蛋白H3第9位赖氨酸和第56位赖氨酸脱乙酰基上发挥作用^[3],其活性异常参与了心血管疾

病、癌症和糖尿病等多种疾病的病理进程^[4]。研究发现,SIRT6能够刺激胰岛 β 细胞中的胰岛素分泌,促进ATP的产生,进而促进葡萄糖代谢^[5]。此外,三酰甘油(triacylglycerol, TG)的合成和脂质代谢也与SIRT6的活性密切相关。研究发现,SIRT6基因被敲除后可以导致小鼠肝细胞中TG合成增加,而TG的过度积累可导致脂肪肝或肝脂肪变性^[6]。本研究旨在通过动物实验和细胞实验分析SIRT6增加动脉粥样硬化斑块稳定性的机制,以为临床治疗动脉粥样硬化提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 实验时间 本实验时间为2019年12月至2021年12月。

1.2 实验材料

1.2.1 实验动物 雄性SPF级野生型C57BL小鼠10只,鼠龄8周龄,体质量25 g,购自空军军医大学动物中心;雄性ApoE^{-/-}小鼠20只,鼠龄8周龄,体质量25 g,

购自北京维通利华实验动物技术有限公司。所有小鼠饲养于空军军医大学动物中心, SPF级环境, 饲养环境温度控制在18~29 °C; 相对湿度控制在40%~70%。构建动脉粥样硬化模型所需要的高脂饲料成分包括15%脂肪、1.25%胆固醇、0.2%胆酸盐。

1.2.2 实验细胞 RAW 264.7巨噬细胞购自美国ATCC公司。

1.2.3 主要实验试剂与仪器 ox-LDL购自广州益源生物科技有限公司, SIRT6抗体(货号: #8864S)、GAPDH抗体(货号: #8864S)、CD68抗体(货号: #26042)、CD36抗体(货号: #14347)购自美国CST公司, 二抗购自西安壮志生物科技有限公司, TUNEL试剂盒购自美国罗氏公司, 小鼠麻醉用异氟烷购自河北一品制药股份有限公司, Bio-Rad凝胶成像系统购自美国伯乐公司, Ad-SIRT6、Ad-CD36购自上海汉恒生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物实验

1.3.1.1 实验动物分组及干预方法 将10只雄性C57BL小鼠作为空白对照组; 将20只雄性ApoE^{-/-}小鼠随机分为动脉粥样硬化组和动脉粥样硬化+SIRT6 Tg组, 每组10只。采用高脂饲料喂养动脉粥样硬化组和动脉粥样硬化+SIRT6 Tg组小鼠16周以构建动脉粥样硬化小鼠模型。持续监测各组小鼠血脂指标, 16周后用异氟烷麻醉并处死各组小鼠, 分离小鼠主动脉, 通过油红O染色发现小鼠动脉管腔内形成了动脉粥样硬化斑块, 视为造模成功。动脉粥样硬化+SIRT6 Tg组通过尾静脉注射200 μl滴度为1 × 10⁹ eg/ml的腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)-SIRT6, 共注射3次, 在1周内完成注射, 以过表达SIRT6。

1.3.1.2 HE染色检测各组小鼠动脉粥样硬化斑块面积 干预16周后, 采用异氟烷麻醉并处死小鼠, 分离小鼠主动脉, 取出动脉粥样硬化斑块组织, 送病理科, 包埋后制作石蜡切片, 脱蜡至水, 进行HE染色, 梯度脱水后在显微镜下观察结果, 蓝色代表细胞核, 红色代表细胞质, 通过Image J软件分析动脉粥样硬化斑块面积^[7]。

1.3.1.3 Masson染色检测各组小鼠动脉粥样硬化斑块中胶原含量 干预16周后, 采用异氟烷麻醉并处死小鼠, 分离小鼠主动脉, 取出动脉粥样硬化斑块组织, 送病理科, 包埋后制作石蜡切片, 脱蜡至水, 将切片置于Bouin液中固定10~15 min, 用Harris苏木素染色4~5 min, 流水下冲洗2 min, 进而在0.5%盐酸酒精中分化10~30 s, 继续流水冲洗5 min, 用Masson复合染色液染色4~5 min, 0.2%醋酸水溶液冲洗, 5%磷钼酸分化5~10 min, 0.2%醋酸水溶液冲洗, 2%苯胺蓝染色液复

染10~30 s, 经无水乙醇脱水后用甘油封固。显微镜下采集图像, 蓝色代表胶原纤维, 红色代表肌纤维、纤维素和红细胞, 用Image J软件分析胶原含量。

1.3.1.4 免疫组化染色检测各组小鼠动脉粥样硬化斑块中CD68表达水平 干预16周后, 采用异氟烷麻醉并处死小鼠, 分离小鼠主动脉, 取出动脉粥样硬化斑块组织, 送病理科, 包埋后制作石蜡切片, 脱蜡至水, 进行抗原修复, 用3%过氧化氢溶液阻断内源性过氧化物酶后用山羊血清进行封闭, 加1:100稀释的一抗CD68, 4 °C孵育过夜后滴加与一抗种属相对应的二抗, 室温下孵育60 min; 滴加新鲜配制的DAB显色液, 棕黄色区域为CD68阳性表达; 复染细胞核后用中性树胶封固; 显微镜下观察到细胞核在苏木素的染色下变成蓝色。计算棕黄色区域占比, 即CD68表达水平。

1.3.2 细胞实验

1.3.2.1 细胞培养 将RAW 264.7巨噬细胞置于含15%胎牛血清的细胞培养基, 培养环境为消毒灭菌细胞孵箱(37 °C, 含5% CO₂, 湿度95%), 24 h后观察贴壁细胞情况, 培养基浑浊后及时更换新鲜培养基。

1.3.2.2 Western blotting法检测巨噬细胞中SIRT6、CD36表达水平 取对数生长期的巨噬细胞, 将其分为空白对照组、ox-LDL组(采用50 μg/ml的ox-LDL干预24 h^[7])、ox-LDL+Ad-SIRT6组(转导腺病毒Ad-SIRT6 24 h, 用50 μg/ml的ox-LDL干预24 h)。用PBS洗涤各组巨噬细胞并充分消化, 提取蛋白后按照操作流程进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE), 并转至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。提前按1:100配好SIRT6、CD36、GAPDH抗体; 脱脂奶粉封闭后于4 °C冰箱中过夜进行一抗孵育, 滴加山羊抗兔IgG抗体孵育1 h, 采用化学发光法利用Bio-Rad凝胶成像系统检测各组巨噬细胞中SIRT6、CD36表达水平。实验独立重复3次。

1.3.2.3 TUNEL染色检测巨噬细胞凋亡率 取对数生长期的巨噬细胞, 将其分为空白对照组、ox-LDL组(采用50 μg/ml的ox-LDL干预24 h^[7])、ox-LDL+Ad-SIRT6组(转导腺病毒Ad-SIRT6 24 h, 用50 μg/ml的ox-LDL干预24 h)、ox-LDL+Ad-SIRT6+Ad-CD36组(转导腺病毒Ad-SIRT6 24 h, 转导腺病毒Ad-CD36 24 h, 用50 μg/ml的ox-LDL干预24 h)。采用TUNEL试剂盒检测巨噬细胞凋亡率, 严格按照试剂盒说明书操作。使用终浓度为100 ng/ml的DAPI染液对细胞染色10 min, 流水冲去染液, 加1滴荧光封片液, 凋亡的巨噬细胞在共聚焦显微镜下表现为绿色荧光, 细胞核在共聚焦显微镜下表现为蓝色荧光。计算巨噬细胞凋亡率。实验独立重复3次。

1.4 统计学方法 采用Graphpad Prism 6.0进行统计分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD- t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

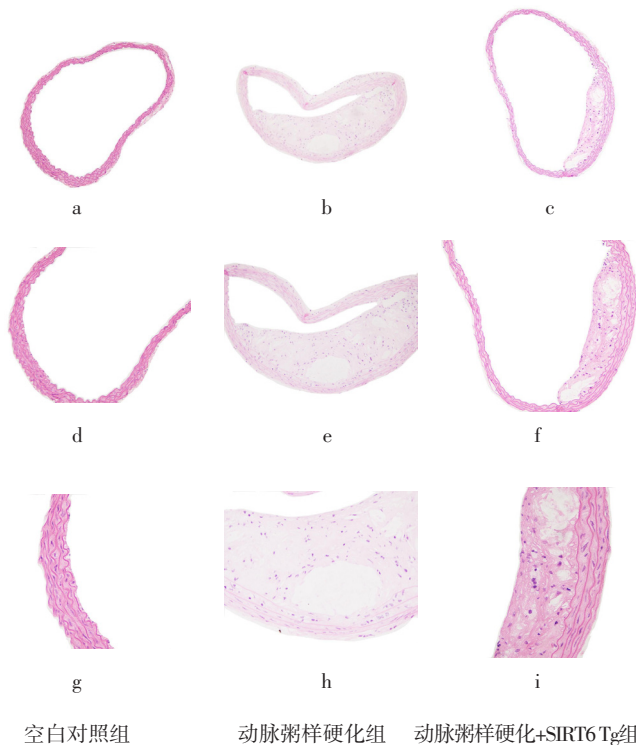
2.1 小鼠动脉粥样硬化斑块面积 空白对照组小鼠动脉粥样硬化斑块面积为0。动脉粥样硬化组小鼠动脉粥样硬化斑块面积为(43.0 ± 8.6)%,高于动脉粥样硬化+SIRT6 Tg组的(13.2 ± 2.6)%,差异有统计学意义($t=10.489, P < 0.001$),见图1。

2.2 小鼠动脉粥样硬化斑块中胶原含量 空白对照组小鼠动脉粥样硬化斑块中胶原含量为0。动脉粥样硬化组小鼠动脉粥样硬化斑块中胶原含量为(7.4 ± 1.2)%,低于动脉粥样硬化+SIRT6 Tg组的(10.8 ± 0.2)%,差异有统计学意义($t=8.838, P < 0.001$),见图2。

2.3 小鼠动脉粥样硬化斑块中CD68表达水平 空白对照组小鼠动脉粥样硬化斑块中CD68表达水平为0。动脉粥样硬化组小鼠动脉粥样硬化斑块中CD68表达水平为(42.3 ± 8.4)%,高于动脉粥样硬化+SIRT6 Tg组的(23.8 ± 4.5)%,差异有统计学意义($t=6.139, P < 0.001$),见图3。

2.4 巨噬细胞中SIRT6、CD36表达水平 空白对照组、ox-LDL组、ox-LDL+Ad-SIRT6组巨噬细胞中SIRT6、CD36表达水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。ox-LDL组、ox-LDL+Ad-SIRT6组巨噬细胞中SIRT6表达水平低于空白对照组,CD36表达水平高于空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$); ox-LDL+Ad-SIRT6组巨噬细胞中SIRT6表达水平高于ox-LDL组,CD36表达水平低于ox-LDL组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1、图4。

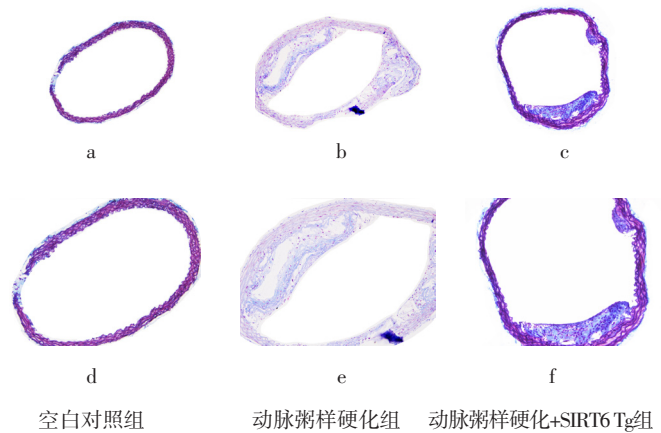
2.5 巨噬细胞凋亡率 空白对照组、ox-LDL组、ox-LDL+Ad-SIRT6组、ox-LDL+Ad-SIRT6+Ad-CD36组巨噬细胞凋亡率分别为(10.00 ± 2.22)%、(78.00 ± 9.36)%、(24.00 ± 4.80)%、(40.00 ± 5.60)%。空白对照组、ox-LDL组、ox-LDL+Ad-SIRT6组、ox-LDL+Ad-SIRT6+Ad-CD36组巨噬细胞凋亡率比较,差异有统计学意义($F=70.340, P < 0.001$)。ox-LDL组、ox-LDL+Ad-SIRT6组、ox-LDL+Ad-SIRT6+Ad-CD36组巨噬细胞凋亡率高于空



注: a-c放大倍数为100倍, d-f放大倍数为200倍, g-i放大倍数为400倍

图1 HE染色检测空白对照组、动脉粥样硬化组、动脉粥样硬化+SIRT6 Tg组小鼠动脉粥样硬化斑块面积

Figure 1 Area of atherosclerotic plaques detected by HE staining in blank control group, atherosclerosis group and atherosclerosis+SIRT6 Tg group



注: a-c放大倍数为100倍, d-f放大倍数为200倍

图2 Masson染色检测空白对照组、动脉粥样硬化组、动脉粥样硬化+SIRT6 Tg组小鼠动脉粥样硬化斑块中胶原含量

Figure 2 Collagen content in atherosclerotic plaques detected by Masson staining in blank control group, atherosclerosis group and atherosclerosis+SIRT6 Tg group

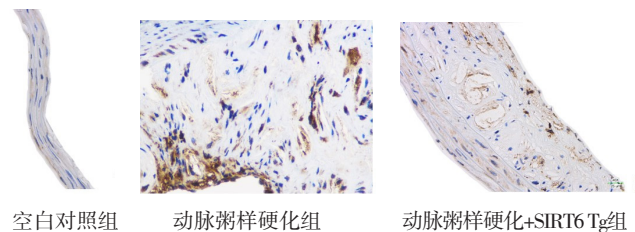


图3 免疫组化染色检测空白对照组、动脉粥样硬化组、动脉粥样硬化+SIRT6 Tg组小鼠动脉粥样硬化斑块中CD68表达水平(×400)

Figure 3 CD68 expression level in atherosclerotic plaques of mice detected by immunohistochemical staining in blank control group, atherosclerosis group, and atherosclerosis+SIRT6 Tg group

白对照组, 差异有统计学意义 (t 值分别为12.240、4.585、8.626, P 值分别为 <0.001 、 0.010 、 <0.001); ox-LDL+Ad-SIRT6组、ox-LDL+Ad-SIRT6+Ad-CD36组巨噬细胞凋亡率低于ox-LDL组, 差异有统计学意义 (t 值分别为8.892、6.034, P 值均 <0.001); ox-LDL+Ad-SIRT6+Ad-CD36组巨噬细胞凋亡率高于ox-LDL+Ad-SIRT6组, 差异有统计学意义 ($t=3.757$, $P=0.020$), 见图5。

表1 空白对照组、ox-LDL组、ox-LDL+Ad-SIRT6组巨噬细胞中SIRT6、CD36表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Comparison of SIRT6 and CD36 expression levels in macrophages in blank control group, ox-LDL group and ox-LDL+Ad-SIRT6 group

组别	SIRT6	CD36
空白对照组	1.000 ± 0.018	1.000 ± 0.023
ox-LDL组	0.464 ± 0.042 ^a	4.685 ± 0.108 ^a
ox-LDL+Ad-SIRT6组	0.677 ± 0.015 ^{ab}	3.144 ± 0.566 ^{ab}
F 值	283.394	92.696
P 值	<0.001	<0.001

注: ox-LDL=氧化低密度脂蛋白; ^a表示与空白对照组比较, $P<0.05$; ^b表示与ox-LDL组比较, $P<0.05$



注: ox-LDL=氧化低密度脂蛋白

图4 Western blotting法检测空白对照组、ox-LDL组、ox-LDL+Ad-SIRT6组巨噬细胞中SIRT6、CD36表达水平

Figure 4 Expression levels of SIRT6 and CD36 in macrophages detected by Western blotting method in blank control group, ox-LDL group and ox-LDL+Ad-SIRT6 group

3 讨论

不稳定动脉粥样硬化斑块的形成是导致急性心血管事件的主要原因, 而大量泡沫细胞的形成在不稳定动脉粥样硬化斑块的病程进展中扮演重要角色^[8]。大量泡沫细胞的聚集可加剧斑块中的炎症反应、促进斑块中新生血管形成, 随着泡沫细胞的不断聚集并且发生凋亡和坏死, 斑块中表现为大量脂质池和坏死核心的形成^[9], 最终导致斑块的不稳定性^[10]。泡沫细胞主要是由巨噬细胞不断摄取ox-LDL形成的, 而这一重要病

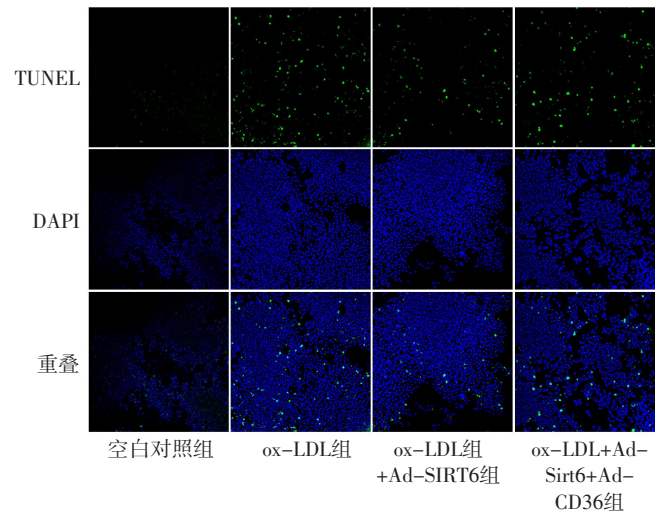


图5 TUNEL染色检测空白对照组、ox-LDL组、ox-LDL+Ad-SIRT6组、ox-LDL+Ad-SIRT6+Ad-CD36组巨噬细胞凋亡率 ($\times 200$)

Figure 5 Apoptosis rate of macrophages detected by TUNEL staining in blank control group, ox-LDL group, ox-LDL+Ad-SIRT6 group and ox-LDL+Ad-SIRT6+Ad-CD36 group

理过程主要受清道夫受体诸如凝集素样ox-LDL受体1、CD36或清道夫受体A的调节^[11]。在这些关键受体中, CD36在泡沫细胞的形成中起主要作用^[12]。据报道, 干预CD36的表达可抑制巨噬细胞对ox-LDL的摄取, 沉默巨噬细胞的CD36基因其对ox-LDL的结合能力明显下降^[13]。综上, CD36在巨噬细胞摄取ox-LDL进而在泡沫细胞的形成过程中发挥关键作用。既往研究表明, SIRT6可以通过调控炎症、葡萄糖和脂质代谢来参与心血管疾病和癌症的病理进程, 其可以有效防止心肌细胞肥大, 抑制心力衰竭的发生; 此外, SIRT6还可以维持内皮细胞的正常功能, 从而延缓动脉粥样硬化的发生发展^[14-15]。然而, SIRT6是否通过调控CD36来增加动脉粥样硬化斑块稳定性目前尚无相关研究。基于此, 本研究旨在通过动物实验和细胞实验分析SIRT6增加动脉粥样硬化斑块稳定性的机制。

本研究动物实验结果显示, 动脉粥样硬化组小鼠动脉粥样硬化斑块面积高于动脉粥样硬化+SIRT6 Tg组, 动脉粥样硬化斑块中胶原含量低于动脉粥样硬化+SIRT6 Tg组, 动脉粥样硬化斑块中CD68表达水平高于动脉粥样硬化+SIRT6 Tg组, 提示过表达SIRT6能够缩小ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块面积, 增加动脉粥样硬化斑块中的胶原含量及减少动脉粥样硬化斑块中巨噬细胞的浸润, 从而增加动脉粥样硬化斑块稳定性。本研究细胞实验结果显示, ox-LDL组、ox-LDL+Ad-SIRT6组巨噬细胞中SIRT6表达水平低于空白对照组, CD36表达水平高于空白对照组, 提示SIRT6/CD36信号通路参与了泡沫细胞形成。ox-LDL+Ad-SIRT6组巨噬细胞中SIRT6表达水平高于ox-LDL组, CD36表达水平低于ox-

LDL组;提示过表达SIRT6可下调CD36的表达水平,进而抑制泡沫细胞形成。ox-LDL组、ox-LDL+Ad-SIRT6组、ox-LDL+Ad-SIRT6+Ad-CD36组巨噬细胞凋亡率高于空白对照组,ox-LDL+Ad-SIRT6组、ox-LDL+Ad-SIRT6+Ad-CD36组巨噬细胞凋亡率低于ox-LDL组,ox-LDL+Ad-SIRT6+Ad-CD36组巨噬细胞凋亡率高于ox-LDL+Ad-SIRT6组,提示过表达SIRT6能够降低巨噬细胞凋亡率,而过表达CD36可减弱SIRT6对巨噬细胞凋亡的抑制作用。由此推测,SIRT6通过下调CD36的表达水平来抑制巨噬细胞的凋亡。

综上所述,SIRT6能够缩小ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块面积,增加动脉粥样硬化斑块中胶原含量,减少动脉粥样硬化斑块中巨噬细胞的浸润,抑制巨噬细胞凋亡,从而增加动脉粥样硬化斑块稳定性,而这一作用是通过下调CD36的表达水平来实现的。本研究为临床通过干预SIRT6/CD36信号通路来治疗不稳定动脉粥样硬化斑块提供了实验依据,为减少急性心血管事件的发生提供了新的治疗方案。但本研究尚存在一定局限性:首先,多种机制如炎症反应、自噬均参与了动脉粥样硬化的病程进展,SIRT6通过何种机制调控CD36,进而抑制泡沫细胞形成,增加动脉粥样硬化斑块稳定性,目前还不得而知;此外,SIRT6/CD36信号通路是否通过调控线粒体动力学,促进线粒体融合,进一步促进巨噬细胞中脂质代谢,这些还有待进一步研究。

作者贡献:王婷婷、张东伟进行研究的构思与设计、可行性分析及文章的撰写,负责文章的质量控制及审校,对文章整体负责、监督管理;王婷婷、李妍负责文章修改;张明明负责结果分析、图片整理;蒋国健负责文献资料收集。

本文无利益冲突。

参考文献

- [1] MURRAY C J L, LOPEZ A D. Measuring the global burden of disease [J]. *N Engl J Med*, 2013, 369 (5): 448-457. DOI: 10.1056/NEJMra1201534.
- [2] MECHANICK J I, FARKOUH M E, NEWMAN J D, et al. Cardiometabolic-based chronic disease, addressing knowledge and clinical practice gaps: JACC state-of-the-art review [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 75 (5): 539-555. DOI: 10.1016/j.jacc.2019.11.046.
- [3] MICHISHITA E, MCCORD R A, BERBER E, et al. SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin [J]. *Nature*, 2008, 452 (7186): 492-496. DOI: 10.1038/nature06736.
- [4] D'ONOFRIO N, SERVILLO L, BALESTRIERI M L. SIRT1 and SIRT6 signaling pathways in cardiovascular disease protection [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 28 (8): 711-732. DOI: 10.1089/ars.2017.7178.
- [5] ZHONG L, D'URSO A, TOIBER D, et al. The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha [J]. *Cell*, 2010, 140 (2): 280-293. DOI: 10.1016/j.cell.2009.12.041.
- [6] D'ONOFRIO N, SERVILLO L, BALESTRIERI M L. SIRT1 and SIRT6 signaling pathways in cardiovascular disease protection [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 28 (8): 711-732. DOI: 10.1089/ars.2017.7178.
- [7] WANG T T, SUN C, HU L, et al. Sirt6 stabilizes atherosclerosis plaques by promoting macrophage autophagy and reducing contact with endothelial cells [J]. *Biochimie Biol Cell*, 2020, 98 (2): 120-129. DOI: 10.1139/bcb-2019-0057.
- [8] FOX K A A, METRA M, MORAIS J, et al. The myth of 'stable' coronary artery disease [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2020, 17 (1): 9-21. DOI: 10.1038/s41569-019-0233-y.
- [9] TABAS I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25 (11): 2255-2264. DOI: 10.1161/01.ATV.0000184783.04864.9f.
- [10] KHAMBHATI J, ALLARD-RATICK M, DHINDSA D, et al. The art of cardiovascular risk assessment [J]. *Clin Cardiol*, 2018, 41 (5): 677-684. DOI: 10.1002/clc.22930.
- [11] CHISTIYAKOV D A, BOBRYSEV Y V, OREKHOV A N. Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20 (1): 17-28. DOI: 10.1111/jemm.12689.
- [12] ENDEMANN G, STANTON L W, MADDEN K S, et al. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268 (16): 11811-11816.
- [13] NOZAKI S, KASHIWAGI H, YAMASHITA S, et al. Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects [J]. *J Clin Invest*, 1995, 96 (4): 1859-1865. DOI: 10.1172/JCI118231.
- [14] 王婷婷, 李妍, 张明明, 等. 异鼠李素通过抑制泡沫细胞形成增加动脉粥样硬化斑块稳定性的机制研究 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2022, 30 (2): 69-74. DOI: 10.12114/j.issn.1008-5971.2022.00.034.
- [15] CAI Y, YU S S, CHEN S R, et al. Nmnat2 protects cardiomyocytes from hypertrophy via activation of SIRT6 [J]. *FEBS Lett*, 2012, 586 (6): 866-874. DOI: 10.1016/j.febslet.2012.02.014.

(收稿日期: 2022-01-18; 修回日期: 2022-03-15)

(本文编辑: 崔丽红)