

非小细胞肺癌中 Biglycan 高表达与肺癌的恶性程度相关

杨志强 温媛媛 钱立勇 李 略

摘 要 **目的** 研究 Biglycan 在人非小细胞肺癌中的表达,并分析其表达与肺癌临床病理特征及恶性程度的关系。**方法** 采用免疫组织化学(SP)法检测 102 例非小细胞肺癌石蜡包埋组织中 Biglycan 蛋白的表达情况,分析其表达与临床病理因素之间的相关性。应用 Western blot 法及 RT-PCR 方法检测肺癌细胞中 Biglycan 的表达情况,采用脂质体介导法将 Biglycan 干扰片段 Biglycan siRNA 转染入肺癌细胞系 A549 和 SK-MES-1 后,利用 RT-PCR 和 Western blot 法检测 Biglycan 在 mRNA 和蛋白水平的表达情况,并应用 MTT 法、Transwell 法检测干扰 Biglycan 表达后对肺癌细胞增殖和侵袭的影响。**结果** Biglycan 在非小细胞肺癌中高表达,其高表达与肺癌高 TNM 分期($P=0.022$)、低分化($P=0.034$)和淋巴结转移($P=0.028$)显著相关。Biglycan 在肺癌细胞系中呈高表达。在干扰 Biglycan 表达后,与未处理组及转染对照片段 control siRNA 组相比,Biglycan 的 mRNA ($P<0.05$)和蛋白($P<0.05$)表达均明显下降,细胞生长增殖能力 [$P<0.01$ (2~4 天); $P<0.01$ (2~4 天)]减弱,细胞侵袭数目($8.41 \pm 1.03, 11.24 \pm 1.21, P<0.05$)减少。**结论** 非小细胞肺癌中 Biglycan 存在普遍高表达现象,并且 Biglycan 的高表达可能参与了肺癌恶性表型的形成过程。

关键词 非小细胞肺癌 Biglycan 临床病理特征 增殖 侵袭

中图分类号 R737.9

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.08.012

Up-regulation of Biglycan is Associated with Malignant Phenotype of Nonsmall Cell Lung Cancer. Yang Zhiqiang, Wen Yuanyuan, Qian Liyong, et al. Zhoushan Hospital, Zhejiang 316000, China

Abstract **Objective** To study the expression and significance of Biglycan in the malignant progression of nonsmall cell lung cancer (NSCLC). **Methods** Immunohistochemistry SP method was used to examine the expression of Biglycan protein in 102 paraffin-embedded specimens. The relationship between the expression of Biglycan protein and clinicopathological factors was analyzed. The expression of Biglycan mRNA and protein were detected by RT-PCR and Western blot. A549 and SK-MES-1 cells were transfected with Biglycan siRNA or control siRNA using Lipofectamine 2000. The cell proliferation was analyzed by MTT and the cell invasion was tested by Transwell. **Results** Immunohistochemical analysis showed that Biglycan expression level was significantly higher in NSCLC tissues, and increased Biglycan expression in NSCLC tissues was related to poor differentiation ($P=0.034$), the higher clinical stage ($P=0.022$) and lymph node metastasis ($P=0.028$). The expression of Biglycan was higher in lung cancer cells than in normal bronchial epithelial cell ($P<0.05$). Compared with untreated and the cells transfected with control siRNA, the level of Biglycan mRNA ($P<0.05$) and protein ($P<0.05$) were decreased in the cells transfected with the Biglycan siRNA. The cell growth rate [$P<0.01$ (day 2-4); $P<0.01$ (day 2-4)] was slower, the numbers of cell invasion ($8.41 \pm 1.03, 11.24 \pm 1.21, P<0.05$) were decreased. **Conclusion** Up-regulation of Biglycan is associated with malignant phenotype of human NSCLC.

Key words NSCLC; Biglycan; Clinicopathological factors; Proliferation; Invasion

双糖链蛋白聚糖(Biglycan)属于富含亮氨酸低分子蛋白聚糖(SLRPs)家族成员,由两个糖胺多糖和 1 个核心蛋白组成。糖胺多糖由硫酸皮质素/硫酸软

骨素组成,核心蛋白分子质量为 38kDa,含 10 个富亮氨酸的重复单位。Biglycan 几乎表达于身体的各个器官,在发育的骨、软骨、纤维组织及牙周组织中广泛分布^[1]。Biglycan 是细胞外基质(ECM)的重要组成部分,ECM 在细胞的黏附、生长分化中起作用,ECM 作为肿瘤细胞生存的微环境,与肿瘤细胞的侵袭和转移密切相关^[2]。Biglycan 表达于细胞表面或细胞周围间质,可在细胞基质旁聚集,且其表达模式随着生长因子和某些病理因素的调节而改变^[3,4]。有研究

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目(81201853);浙江省自然科学基金资助项目(Y2111209,LY16H160058);浙江省医药卫生科技计划项目(2015121805)

作者单位:316000 浙江省舟山医院(杨志强、温媛媛、钱立勇、李略);325035 温州医科大学(杨志强)

通讯作者:温媛媛,电子信箱:wenyuanyuan1022@sina.cn

已证实 Biglycan 可以直接或间接调控细胞迁移、黏附与生长等生物学行为^[5]。另外,有研究表明,Biglycan 在调控炎症反应、骨骼发育、肌肉发育和再生方面也起到关键作用^[6-10]。近年来大量研究发现,Biglycan 广泛表达于各种肿瘤组织中,如结肠癌、卵巢癌、肝癌、胰腺癌与牙源性肿瘤等,提示 Biglycan 可能与肿瘤的发生发展密切相关^[11-15]。

本研究拟采用免疫组织化学方法检测 Biglycan 在非小细胞肺癌组织中的表达情况,分析其表达与肺癌患者临床病理因素之间的相关性。采用 RNA 干扰技术,观察沉默 Biglycan 基因表达后对非小细胞肺癌细胞增殖和侵袭能力的影响,探讨 Biglycan 在肺癌发生发展中的作用。

材料与方法

1. 材料:(1)标本来源与患者资料:收集浙江省舟山医院病理科 2000~2014 年原发性非小细胞肺癌患者手术切除标本存档蜡块 102 例,所有患者术前均未接受放、化疗。其中,男性 59 例,女性 43 例。患者年龄 33~76 岁(中位年龄 57 岁)。按 WHO(2010 年)组织学分类标准:鳞状细胞癌 46 例,腺癌 56 例。按国际抗癌联盟(UICC)2002 年修订的 TNM 分期标准:I 期 32 例,II 期 26 例,III 期 34 例,IV 期 10 例。淋巴结转移 62 例,无淋巴结转移 40 例。标本均经 10% 中性甲醛固定,石蜡包埋,HE 常规染色后明确诊断。所有标本的使用均征得了伦理委员会同意且患者本人知情同意。(2)主要试剂:免疫组织化学(SP)法检测试剂盒、DAB 酶底物显色试剂盒(DAB-0031)(中国福州迈新生物技术公司);兔抗人 Biglycan 抗体(Santa Cruz), β -actin 抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);Biglycan siRNA(Santa Cruz);DMEM 培养液、胎牛血清(美国 Gibco 公司);甲基噻唑基四唑(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)(美国 Sigma 公司);Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司);RNA PCR Kit(AMV) Ver. 3.0 试剂盒(大连 TaKaRa 公司);PCR 引物合成与测序委托大连 TaKaRa 公司进行。

2. 方法:(1)免疫组织化学染色及结果判定:组织经中性甲醛固定、石蜡包埋,制成 4 μ m 连续切片。按照 SP 免疫组织化学检测试剂盒说明书步骤进行 Biglycan(1:200)免疫组织化学染色。PBS 代替第 1 抗体做阴性对照,用已知阳性片做阳性对照。Biglycan 判定标准:Biglycan 以细胞质中出现棕黄色颗粒为阳性显色。每张切片随机选取 5 个高倍视野($\times$

400),每高倍视野计数 100 个目的细胞。将 Biglycan 表达阳性率分为以下 4 个等级: $\leq 25\%$ 为 0 分,26%~50% 为 1 分,51%~75% 为 2 分, $> 75\%$ 为 3 分。根据免疫组化染色强度分为 3 个等级:无着色计为 0 分,浅黄色颗粒计为 1 分,棕黄色颗粒计为 2 分。以 Biglycan 表达阳性率和染色强度的分值乘积作为每 1 例的积分,积分 ≥ 3 分者判定为阳性,积分 < 3 分者判定为阴性。(2)细胞培养、RNA 干扰:人正常支气管上皮细胞系 HBE、人肺腺癌细胞系 A549 与人肺鳞癌细胞系 SK-MES-1。3 种细胞均为贴壁生长的细胞系,均接种在 DMEM 培养液(含 10% 胎牛血清、100U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素)中,于 37 $^{\circ}$ C、含 5% CO₂ 湿润空气的培养箱中培养。使用 Biglycan siRNA,阴性对照(未转染组、control siRNA 组),使用脂质体 Lipofectamine 2000 将 siRNA 导入肺癌细胞系 A549 与 SK-MES-1 中(具体步骤按试剂说明书进行)。转染 48h 后进行后续 Western blot 法和 RT-PCR 检测。(3)Western blot 法检测:于 4 $^{\circ}$ C 下取 1~2g 标本,加约 5 倍湿重的裂解缓冲液,粉碎匀浆后,4 $^{\circ}$ C 静置 24h,低温高速离心(4 $^{\circ}$ C, 12000r/min, 40min),提取上清即为总蛋白。经电泳、转印,5% 正常小牛血清封闭,抗 Biglycan(1:400)和抗 β -actin(1:500)4 $^{\circ}$ C 下孵育,过夜;于二抗室温下孵育 2h;ECL 显色,X 线胶片曝光成像,经自动电泳凝胶成像分析仪采集图像。(4)RT-PCR 检测:采用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,利用 RNA PCR Kit(AMV) Ver. 3.0 试剂盒反转录获得 cDNA,扩增 Biglycan,以 β -actin 为内参。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后成像分析。Biglycan PCR 上游引物:5'-GGACTCT-GTCACACCCACCT-3';下游引物:5'-AGCTCG-GAGATGTCGTTGTT-3'。 β -actin PCR 上游引物:5'-CGGCATTGTCAGCAACTG-3';下游引物:5'-CGCTCGGTCAGGATCTTC-3'。(5)MTT 法:将单个细胞悬液分别接种于 96 孔培养板中,每孔含 10⁴ 个细胞,培养 24h,每孔加入 MTT 溶液继续培养 4h,加入 DMSO,490nm 波长下测定各孔吸收值,以不含细胞的等体积培养基作对照。绘制细胞生长曲线。(6)基质胶侵袭实验(Transwell 侵袭小室测定):在 Transwell 小室上室加入 100 μ l 预冷的用的 Matrigel 基质胶(按基质胶与无血清 DMEM 培养基 1:7 稀释),下室中加入 600 μ l 含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基,将转染后 24h 的肺癌细胞接种到上室,并于 37 $^{\circ}$ C 含 5% CO₂ 孵箱中培养 32h 后吸尽培养基,PBS 清洗后,

甲醇室温下固定 15min,用棉签擦掉微孔膜上表面的细胞,苏木素染色,室温干燥过夜。取下微孔膜,置载玻片上,显微镜下计数侵袭至滤膜下表面的细胞数,每张滤膜随机计数 10 个视野(×400),取均值。实验重复 3 次,数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

3. 统计学方法:采用 SPSS 13.0 统计学分析软件,免疫组化采用 *Pearson Chi - Square* 检验。RT - PCR、Western blot 法、MTT 和细胞侵袭实验结果均采用 *t* 检验进行数据分析,用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 在非小细胞肺癌组织中 Biglycan 蛋白高表达,并与肺癌的低分化、高 pTNM 分期和淋巴结转移相关:为了明确 Biglycan 蛋白在肺癌组织中的表达情况,笔者采用免疫组织化学方法,结果显示,在人肺正

常支气管黏膜上皮细胞中,Biglycan 蛋白表达水平低下,然而在检测的 102 例非小细胞肺癌标本中,其中 75 例标本(73.5%)Biglycan 呈现胞质强阳性,具有明显高表达特征(图 1)。笔者进一步分析了 102 例非小细胞肺癌组织 Biglycan 蛋白表达与临床病理因素之间的关系。结果发现,Biglycan 高表达与肺癌的低分化($P = 0.034$)、高 pTNM 分期($P = 0.022$)和淋巴结转移显著相关($P = 0.028$)。其中,在 46 例低分化病例中,42 例(91.3%)存在 Biglycan 高表达;Ⅲ~Ⅳ期病例中 93.2%(41/44)的病例 Biglycan 为高表达;在伴有淋巴结转移的病例中 95.0%(38/40)的病例 Biglycan 存在高表达。此外,统计学显示 Biglycan 的高表达与患者的年龄、性别和组织学类型无明显相关性($P > 0.05$,表 1)。

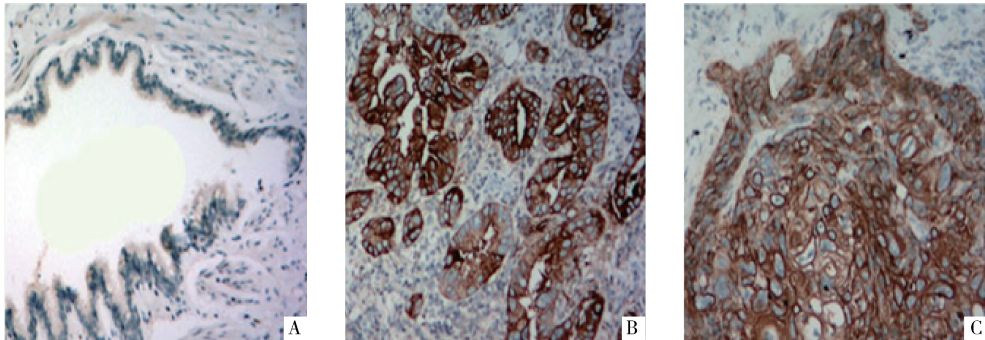


图 1 Biglycan 在肺组织中的表达情况(×200)

A. Biglycan 在肺正常支气管黏膜中低表达;B. Biglycan 在肺腺癌组织中高表达,表达定位于细胞质;
C. Biglycan 在肺鳞状细胞癌组织中高表达,表达定位于细胞质

表 1 102 例非小细胞肺癌组织中 Biglycan 的表达与临床病理因素之间的关系

临床病理因素	n	Biglycan			P
		+	阳性率(%)	χ^2	
性别					
男性	59	43	72.8	0.312	0.743
女性	43	32	74.4		
年龄(岁)					
<57	56	42	75.0	0.391	0.697
≥57	46	33	71.7		
组织学类型					
腺癌	52	40	76.9	0.420	0.656
鳞状细胞癌	50	35	70.0		
分化程度					
高分化	56	33	58.9	5.111	0.034
低分化	46	42	91.3		
临床分期					
Ⅰ+Ⅱ	58	34	58.6	5.481	0.022
Ⅲ+Ⅳ	44	41	93.2		
淋巴结转移					
-	62	37	59.7	5.341	0.028
+	40	38	95.0		

2. 在肺癌细胞系中 Biglycan 存在表达上调,沉默 Biglycan 后 Biglycan mRNA 和蛋白表达下调:为了进一步证实 Biglycan 在肺癌细胞系中也具有普遍高表达的现象,笔者应用 RT - PCR 和 Western blot 法分别检测了 3 种细胞系 HBE(人正常支气管上皮细胞系)、A549(肺腺癌细胞系)与 SK - MES - 1(肺鳞癌细胞系)中 Biglycan 的 mRNA 和蛋白表达情况。结果显示,在检测的两种肺癌细胞系 A549 与 SK - MES - 1 中,Biglycan mRNA 和蛋白的表达均明显高于 HBE,且差异具有统计学意义($P < 0.05$,图 2 中 A、B)。为了验证 Biglycan siRNA 的干扰效果,笔者在实验的两种肺癌细胞系 A549 与 SK - MES - 1 中瞬时转染 Biglycan siRNA,并以未处理及转染 control siRNA 作为阴性对照组,运用 RT - PCR 和 Western blot 方法检测相应细胞的 Biglycan mRNA 和蛋白表达,并统计其表达间的差异。结果显示,在实验组瞬

时转染 Biglycan siRNA 48h 后, Biglycan mRNA 和蛋白表达均较对照组显著下调, 且差异有统计学意义

($P < 0.05$, 图 2 中 C、D), 证明实验选用的 Biglycan siRNA 干扰效果是确定的。

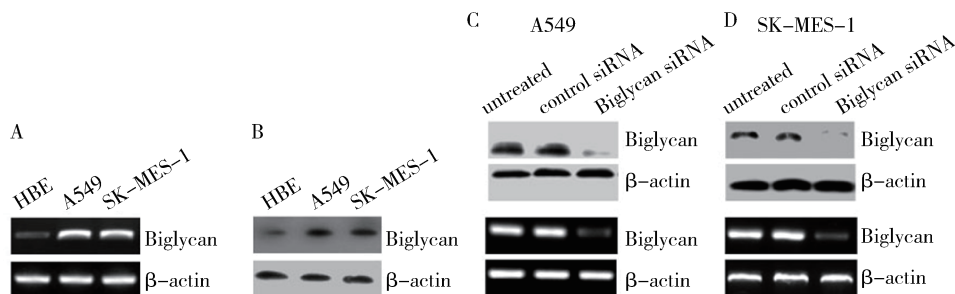


图 2 Biglycan 在肺正常支气管上皮细胞系与肺癌细胞系中的表达

A. Biglycan mRNA 在肺癌细胞系 A549 与 SK-MES-1 中表达高于肺正常支气管上皮细胞系; B. Biglycan 蛋白在肺癌细胞系 A549 与 SK-MES-1 中表达高于肺正常支气管上皮细胞系; C. 在肺癌 A549 细胞系中, 与对照组相比, 干扰 Biglycan 表达后, Biglycan mRNA 与蛋白表达明显下调; D. 在肺癌 SK-MES-1 细胞系中, 与对照组相比, 干扰 Biglycan 表达后, Biglycan mRNA 与蛋白表达明显下调

3. 沉默 Biglycan 表达可抑制肺癌细胞的增殖: 为了验证“沉默”Biglycan 后对肺癌细胞增殖能力的影响, 笔者进行了 MTT 实验, 结果表明, 在肺癌细胞系 A549 与 SK-MES-1 转染 Biglycan siRNA 1 天后, 与转染 control siRNA 组或未处理组相比, 细胞相应的吸

光度值无明显改变, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。但在转染 Biglycan siRNA 2~4 天后, 细胞吸光度值较第 1 天有明显下降, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 3 中 A、B)。以上结果提示沉默 Biglycan 表达可显著抑制肺癌细胞的增殖能力。

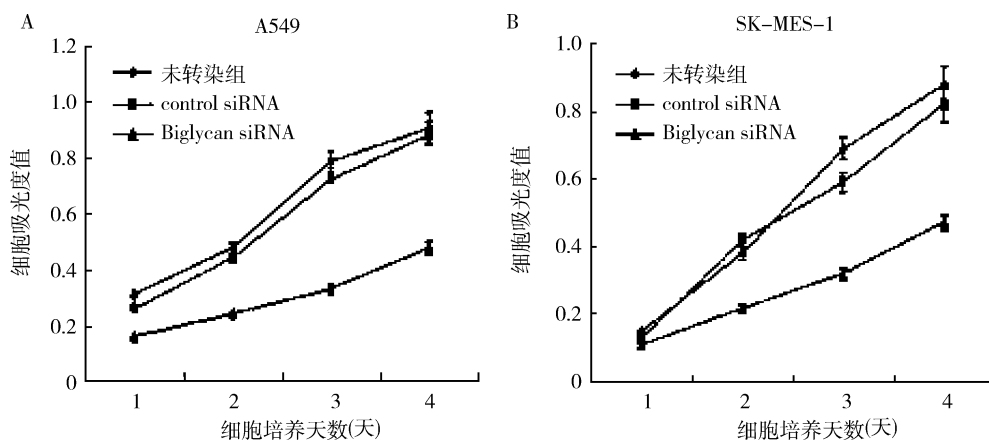


图 3 MTT 结果显示, 干扰 Biglycan 表达后 A549 与 SK-MES-1 细胞增殖能力明显减弱

4. 沉默 Biglycan 表达可显著抑制肺癌细胞侵袭能力: 为了观察“沉默”Biglycan 后对肺癌细胞侵袭能力的影响, 笔者进行了 Transwell 侵袭实验, 结果表明, 肺癌细胞系 A549 与 SK-MES-1 在转染 Biglycan siRNA 后侵袭至滤膜下表面的细胞数分别为 8.41 ± 1.03 、 11.24 ± 1.21 , 与对照组 control siRNA (40.20 ± 3.64 , 52.12 ± 4.68) 或未处理组 (42.45 ± 3.86 , 49.22 ± 1.12) 相比较, 均明显减少, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4)。以上结果提示, 沉默 Biglycan 表达可显著抑制肺癌细胞的侵袭能力。

讨 论

许多研究表明, Biglycan 作为 SLPRs 的重要成员, 过表达 Biglycan 在肿瘤恶性进展中起重要作用^[13-15]。Zhu 等^[16]研究发现在 170 例食管鳞状细胞癌组织标本中, 高表达 Biglycan 与肿瘤的侵袭性、淋巴结转移和临床分期呈正相关, 且与患者 5 年生存率呈负相关。Liu 等^[17]采用免疫组化及实时定量 PCR 法检测发现在子宫内膜癌患者血清中 Biglycan 的浓度与临床分期、组织学分级、淋巴结转移呈显著相关, 且 Biglycan 表达上调与子宫内膜癌的侵袭、转移等恶性生物学行为相关。然而, 有研究报道, 在胰腺癌中,

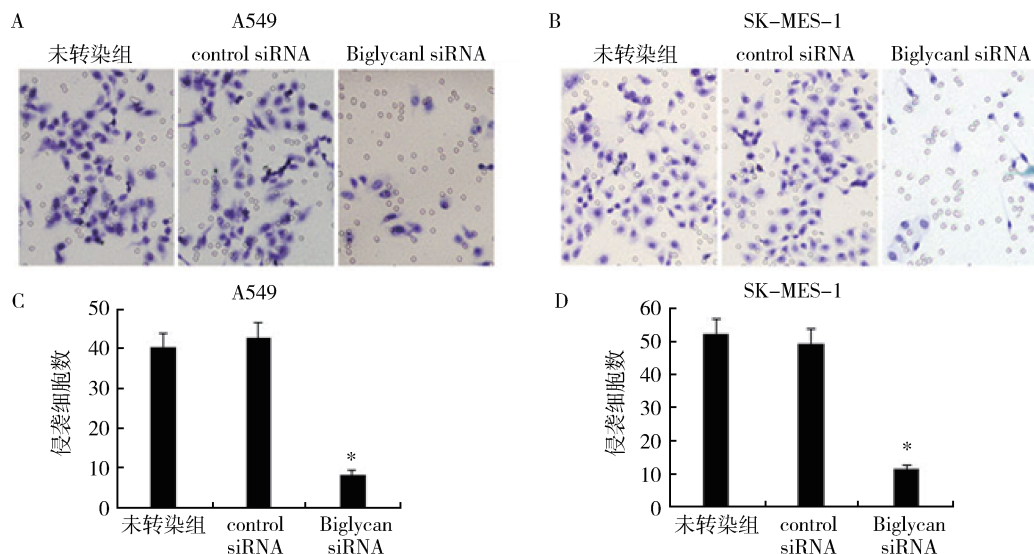


图 4 干扰 Biglycan 表达后 A549 与 SK-MES-1 细胞侵袭能力明显减弱

A. 与未转染组和对照组相比,干扰 Biglycan 表达后,A549 侵袭细胞数目明显减少;B. 与未处理组和对照组相比,干扰 Biglycan 表达后,SK-MES-1 侵袭细胞数目明显减少;C. 肺癌细胞系 A549 各组别中细胞侵袭数目的统计学分析;D. 肺癌细胞系 SK-MES-1 各组别中细胞侵袭数目的统计学分析。与未转染组相比较,* $P < 0.05$

Biglycan 可通过诱导 G₁ 期细胞周期阻滞来抑制细胞生长与增殖^[14]。由此可见,Biglycan 对不同组织肿瘤细胞生物学行为的影响不同。本研究免疫组化结果发现,Biglycan 在非小细胞肺癌中高表达,且 Biglycan 高表达与肺癌的低分化、高 pTNM 分期和淋巴结转移显著相关($P = 0.034$, $P = 0.022$, $P = 0.028$)。RT-PCR 与 Western blot 法检测结果发现,Biglycan 在非小细胞肺癌细胞中表达明显高于正常支气管黏膜上皮细胞,这与 Zhe 等和 Li 等的研究相一致。这些研究结果提示高表达 Biglycan 在非小细胞肺癌的恶性进展中起重要作用。

肿瘤细胞表面黏附分子减少,与 ECM 之间分离,可将 ECM 降解,从而可使癌细胞脱落进入血液循环,进而肿瘤细胞发生转移和侵袭^[18]。Biglycan 作为 ECM 的重要组成成分,因此与肿瘤的侵袭和转移密切相关。研究发现,Biglycan 可通过 cdk-2 与 P27 依赖的信号途径来促进细胞增殖^[19]。过表达 Biglycan 可通过上调 VEGF 的表达来促进结肠癌细胞的增殖,并抑制细胞凋亡^[20]。Biglycan 可通过抑制 caspase-3 的活性来抑制肾小球系膜细胞的凋亡。以上研究都表明 Biglycan 与肿瘤细胞的侵袭增殖密切相关,在本研究中,笔者研究发现,与未处理组和转染对照 siRNA 组相比较,干扰 Biglycan 表达后,肺癌细胞 A549 和 SK-MES-1 增殖能力显著降低。同时侵袭实验结果表明,肺癌细胞侵袭能力明显减弱。

综上所述,Biglycan 在非小细胞肺癌恶性进程中发挥重要作用,以其作为靶点将为肺癌的治疗提供新思路。Biglycan 作为癌基因可通过多种信号途径来调节肿瘤细胞的生物学行为,这有待于进一步研究。

参考文献

- Chung IS, Son YI, Ko YJ, *et al.* Peritumor injections of purified tumstatin delay tumor growth and lymphatic metastasis in an orthotopic oral squamous cell carcinoma model [J]. *Oral Oncol*, 2008, 44(12): 1118-1126
- Hocking AM, Shinomura T, McQuillan DJ. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix [J]. *Matrix Biol*, 1998, 17(1): 1-19
- Gotte M, Sofeu Feugaing DD, Kresse H. Biglycan is internalized via a chlorpromazine-sensitive route [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2004, 9(3): 475-481
- Wadhwa S, Embree MC, Bi Y, *et al.* Regulation, regulatory activities, and function of biglycan [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2004, 14(4): 301-315
- Kinsella MG, Bressler SL, Wight TN. The regulated synthesis of versican, decorin, and biglycan: extracellular matrix proteoglycans that influence cellular phenotype [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2004, 14(3): 203-234
- Schaefer L, Babelova A, Kiss E, *et al.* The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(8): 2223-2233
- Berendsen AD, Fisher LW, Kilts TM, *et al.* Modulation of canonical Wnt signaling by the extracellular matrix component biglycan [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(41): 17022-17027
- Inkson CA, Ono M, Bi Y, *et al.* The potential functional interaction

- of biglycan and WISP-1 in controlling differentiation and proliferation of osteogenic cells [J]. *Cells Tissues Organs*, 2009, 189(1-4): 153-157
- 9 Casar JC, McKechnie BA, Fallon JR, *et al.* Transient up-regulation of biglycan during skeletal muscle regeneration: delayed fiber growth along with decorin increase in biglycan-deficient mice [J]. *Dev Biol*, 2004, 268(2): 358-371
 - 10 Mercado ML, Amenta AR, Hagiwara H, *et al.* Biglycan regulates the expression and sarcolemmal localization of dystrobrevin, syntrophin, and nNOS [J]. *FASEB J*, 2006, 20(10): 1724-1726
 - 11 Gu X, Ma Y, Xiao J, *et al.* Up-regulated biglycan expression correlates with the malignancy in human colorectal cancers [J]. *Clin Exp Med*, 2012, 12(3): 195-199
 - 12 Pan S, Cheng L, White JT, *et al.* Quantitative proteomics analysis integrated with microarray data reveals that extracellular matrix proteins, catenins, and p53 binding protein 1 are important for chemotherapy response in ovarian cancers [J]. *OMICS*, 2009, 13(4): 345-354
 - 13 Nishino R, Honda M, Yamashita T, *et al.* Identification of novel candidate tumour marker genes for intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *J Hepatol*, 2008, 49(2): 207-216
 - 14 Weber CK, Sommer G, Michl P, *et al.* Biglycan is overexpressed in pancreatic cancer and induces G1-arrest in pancreatic cancer cell lines [J]. *Gastroenterology*, 2001, 121(3): 657-667
 - 15 Modolo F, Biz MT, Martins MT, *et al.* Expression of extracellular matrix proteins in adenomatoid odontogenic tumor [J]. *J Oral Pathol Med*, 2010, 39(3): 230-235
 - 16 Zhu YH, Yang F, Zhang SS, *et al.* High expression of biglycan is associated with poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Exp Pathol*, 2013, 6(11): 2497-2505
 - 17 Liu Y, Li W, Li X, *et al.* Expression and significance of biglycan in endometrial cancer [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2014, 289(3): 649-655
 - 18 Barkan D, Green JE, Chambers AF, *et al.* Extracellular matrix: a gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth [J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(7): 1181-1187
 - 19 Shimizu-Hirota R, Sasamura H, Kuroda M, *et al.* Extracellular matrix glycoprotein biglycan enhances vascular smooth muscle cell proliferation and migration [J]. *Circ Res*, 2004, 94(8): 1067-1074
 - 20 刑晓静, 谷小虎, 马天飞. Biglycan 及 VEGF 对结肠癌细胞增殖、凋亡能力的影响及分子机制 [J]. *肿瘤学杂志*, 2014, 20(6): 471-476 (收稿日期: 2015-12-28)
- (修回日期: 2016-01-04)

下调心肌 CD36 的表达对肥胖小鼠心肌活性氧簇生成的影响

张逸杰 刘 景 戴明彦 曹 权 何文博 包明威

摘 要 **目的** 研究定向下调心肌 CD36 的表达对高脂饮食诱导的肥胖小鼠心肌组织中活性氧簇(ROS)含量的影响。**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,向心肌内分别注射靶向 CD36(O-CD36)或靶向无关基因(N-mock、O-mock)的重组慢病毒。10 周后,取小鼠心室组织检测 CD36 的 mRNA 及蛋白表达水平;行油红 O 染色检测心肌组织内中性脂质含量;并使用冷冻切片染色法及流式细胞术检测心肌细胞内 ROS 含量。**结果** 慢病毒介导的 RNA 干扰显著下调了 O-CD36 小鼠心肌组织中 CD36 的表达。肥胖引起心肌组织内中性脂质蓄积,下调心肌 CD36 的表达显著减少了中性脂质的含量。高脂饮食还导致心肌 ROS 的含量显著增加,而下调 CD36 的表达可以改善甚至逆转这一进程。**结论** CD36 在高脂肪酸代谢所引起的 ROS 生成增加中起重要作用,定向下调心肌 CD36 的表达可以减少心肌组织 ROS 的含量,改善心肌氧化应激。

关键词 RNA 干扰 CD36 肥胖模型 中性脂质 活性氧簇

中图分类号 R589.2 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.08.013

Effects of Cardiac CD36 Inhibition on Generation of Myocardial Reactive Oxygen Species. Zhang Yijie, Liu Jing, 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 cardiac-specific CD36 inhibition on generation of myocardial reactive oxygen species

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);中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2042014k0172)

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