

- 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

(ROS). **Methods** Four-week-old male C57 mice were randomized into normal control group (N-mock), obese control group (O-mock) and obese intervention group (O-CD36). High-fat diet (HFD) was used to induce obesity in this study. Mice were subjected to intramyocardial injection with recombinant lentiviral vectors carrying short hairpin RNAs targeting murine CD36 (for O-CD36) or irrelevant gene (for N-mock and O-mock). Ten weeks later, ventricular tissues were obtained. CD36 mRNA and protein expression were measured by RT-PCR and Western blot. Myocardial neutral lipid content was detected by oil red O staining. Two methods were chosen to measure the ROS production in the myocardium. **Results** Lentivirus-mediated RNAi effectively down-regulated CD36 expression in O-CD36 mice heart. HFD induced obesity increased neutral lipid deposition in the heart, but this process was ameliorated by cardiac CD36 inhibition. HFD feeding induced myocardial ROS overproduction, which was reversed by cardiac-specific CD36 suppression. **Conclusion** CD36 plays an important role in myocardial ROS overproduction during fatty acid hypermetabolic states. Targeted cardiac CD36 inhibition improves myocardial ROS generation, and ameliorates myocardial oxidative stress as well.

Key words RNA interference; CD36; Obese models; Neutral lipids; Reactive oxygen species

肥胖是一种以体脂含量异常增高为主要表现的慢性代谢性疾病,可显著增加心血管疾病和 2 型糖尿病的发生率。随着生活水平的提高、居民膳食结构的改变以及静坐生活方式的蔓延,肥胖已成为我国公共卫生领域不可忽视的问题。据 WHO 统计,2014 年全球超过 18 岁的成年人有 6 亿属于肥胖人群^[1]。心脏是高耗能的器官,主要通过脂肪酸(fatty acid, FA)β氧化及葡萄糖有氧氧化生成 ATP 满足自身能耗^[2]。病理性肥胖多伴随胰岛素抵抗,后者导致心肌细胞利用葡萄糖受阻,转而大量摄取 FA 氧化供能。心肌能量代谢谱的这种改变使得β氧化的有害代谢副产物活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)异常增多,超出机体的清除能力^[3,4]。ROS 是性质活泼的氧化剂,可介导氧化应激、钙调控异常、内质网应激并降低 ATP 的生成效率,从而引起一系列的心肌毒性作用,最终可导致心脏重构和心力衰竭^[3,5-7]。

CD36 又名脂肪酸转位酶,是 FA 分解代谢中最重要的酶之一。生理情况下,该酶分布于胞质内及胞膜上,位于胞膜者介导 FA 由胞外向胞内跨膜转运,心肌细胞经此途径摄取的 FA 超过其摄取总量的 70%^[8]。肥胖或糖尿病时,位于胞质的 CD36 可移位到胞膜,介导更多的 FA 摄入入胞参与β氧化^[9]。本研究中,笔者试图通过慢病毒介导的 RNA 干扰来降低肥胖小鼠心肌 CD36 的表达,研究此干预对心肌细胞内脂质蓄积及 ROS 含量的影响。

材料与方法

1. 实验动物:4 周龄 SPF 级雄性 C57 小鼠,体重 17.51 ± 0.37 g,饲养于笔者医院动物实验中心屏障环境。屏障内温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$,湿度 45%~50%,光照/黑暗比 12h:12h。将动物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)。N-mock 给予正常饮食(D12450B,含 10%

脂肪、20% 蛋白及 70% 的糖类),O-mock、O-CD36 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康生物科技公司。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,16 周龄时取材检测(图 1)。本实验严格遵循实验动物使用的“3R 原则”。

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)、正置明场显微镜(Eclipse Ci-E,日本 Nikon 公司)、正置荧光显微镜(Eclipse Ti-SR,日本 Nikon 公司)、恒流泵(LEAD-2,英国 Longer 公司)、冰冻切片机(Cryotome E,美国 Thermo Fisher 公司)、流式细胞仪(FACSCalibur,美国 BD biosciences 公司)等。主要试剂包括 TRIzol (15996-026,美国 Thermo Fisher 公司)、逆转录试剂盒(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)、CD36 一抗(sc-9154,美国 Santa Cruz 公司)、GAPDH 一抗(CW0100A,北京康为世纪生物技术有限公司)、II 型胶原酶(C6885-1G,美国 Sigma-Aldrich 公司)、2'7'-二氯荧光素二乙酸盐(S0033,上海碧云天生物技术有限公司)、OCT 包埋剂(4583,美国 Sakura 公司)、抗荧光淬灭封片剂(P0126,上海碧云天生物技术有限公司)、二氢乙啶(D7008,美国 Sigma-Aldrich 公司)。

3. 慢病毒制备:研究所用慢病毒载体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,另选取无关的绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因作为对照。构建靶向小鼠 CD36 (5'-CCGGCAGTCGGAGACATGCT-

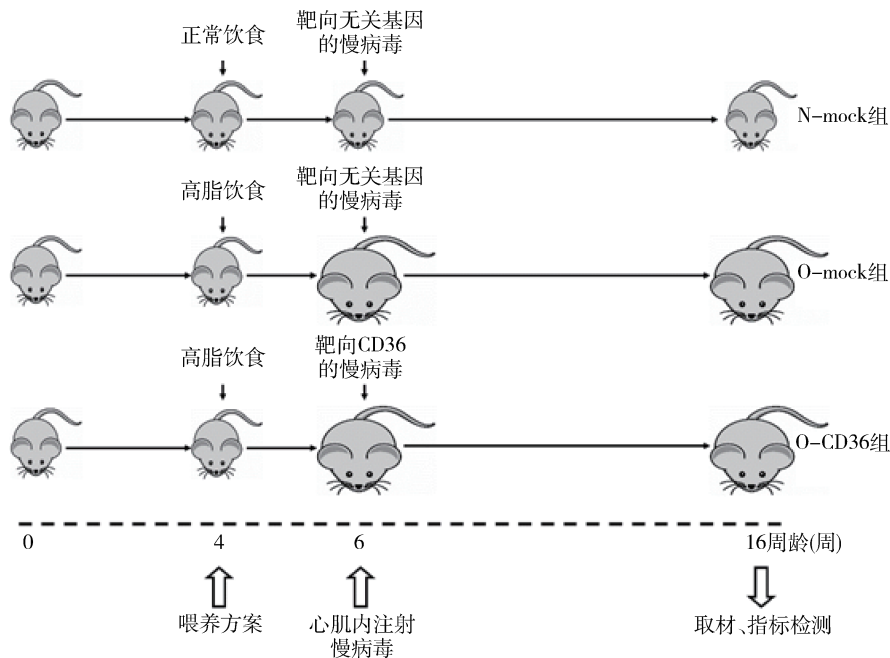


图1 研究方案

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

TATCTCGAGATAAGCATGTCTCCGACTGTTTTG - 3') 及 GFP (5' - CCGGTCACCTTCACCCTCTCCACT-TCTCGAGAAGTGGAGAGGCTGAAGGTGATTTTTG - 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. 心肌注射介导定向 RNA 干扰: 手术参照 Erhe Gao 教授的方法, 略作改动。麻醉小鼠后, 于心前区 3~5 肋间沿左锁骨中线做一长约 1cm 切口, 沿切口缝制荷包松结备用^[10]。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。使用自制的微量注射针 (针尖外径 31 gauge) 经左心室前壁、后壁两个点向心肌内注射慢病毒共 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。操作过程中心脏外露时间不超过 30s, 小鼠存活率超过 90%。

5. RT-PCR 检测心肌中 CD36 的 mRNA 表达: 用 TRIzol 法提取心室组织中总 RNA, 依照反转录试剂盒说明书合成 cDNA, 再按 SYBR Green 试剂盒说明书进行荧光定量 PCR。选取 GAPDH 作为内参。引物序列如下: CD36 正向引物 5' - AGCAACTGGTG-GATGTTTC - 3', 反向引物 5' - TCAAGGGAGAG-CACTGTTTT - 3'; GAPDH 正向引物 5' - CTCATGAC-CACAGTCCATGC - 3', 反向引物 5' - GGATGACCTT-

GCCCACAGCC - 3'。

6. Western blot 法检测心肌中 CD36 的蛋白表达: 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 CD36 1:200, GAPDH 1:1000。凝胶图像采用 Image J 软件分析。

7. 油红 O 染色检测心肌中性脂质含量: 心肌中过多的 FA 多以中性脂质的形式沉积, 可通过油红 O 染色检测。取小鼠左心室前壁心肌组织固定后制作冷冻切片 (7 μ m), 经油红 O 染色及苏木素复染, 明场下 400 倍拍照, 并用 Image - Pro Plus 6.0 分析油红 O 的相对着色面积, 以反映心肌中性脂质的含量。

8. 不同方法检测心肌组织中 ROS 含量: ROS 性质活泼, 极不稳定, 测量误差较大, 本研究使用两种方法来检测其含量。(1) 采用胶原酶解法分离单个心室肌细胞, 200 目筛网过滤, 与 10 μ mol/L 的 2'7' - 二氯荧光素二乙酸盐 (2'7' - dichlorofluorescein diacetate, DCFH - DA) 在 37℃ 避光孵育 20min, 立即上流式细胞仪检测平均荧光强度 (激发/发射波长 488/525nm), 该值可反映心肌细胞内的 ROS 含量^[11]。(2) 取小鼠左心室前壁心肌组织制作冷冻切片 (10 μ m), 与 10 μ mol/L 的二氢乙啶 (dihydroethidium,

DHE)在 37℃ 避光孵育 30min,荧光显微镜下 200 倍拍照,并用 Image - Pro Plus 6.0 分析心肌中 ROS 的相对荧光强度。

9. 统计学方法:采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组样本均数的比较采用单因素方法分析,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:经过 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 $33.61 \pm 1.12\text{g}$ vs N - mock 组 $27.08 \pm 1.42\text{g}$, $P < 0.001$)。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 $33.61 \pm 1.12\text{g}$ vs O - CD36 组 $33.33 \pm 1.08\text{g}$, $P > 0.05$)(图 2)。

2. RNA 干扰下调了心肌 CD36 的表达:RT - PCR 检测结果提示,肥胖并未引起心肌 CD36 的 mRNA 表达的显著改变,而慢病毒介导的 RNA 干扰下调了 O -

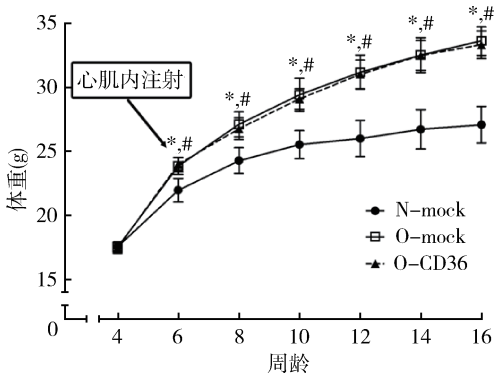


图 2 小鼠体重变化

图示不用饮食方案对小鼠体重的影响(每组 $n = 8$); N - mock vs O - mock, $^* P = 0.000$; N - mock vs O - CD36, $^* P = 0.000$

CD36 小鼠心肌中约 50% 的 CD36 的 mRNA 表达(图 3A),Western blot 法检测结果与之一致,肥胖并未引起 CD36 蛋白表达的改变,RNA 干扰显著下调了 O - CD36 组小鼠心肌组织中 CD36 的蛋白表达(图 3 中 B、C)。

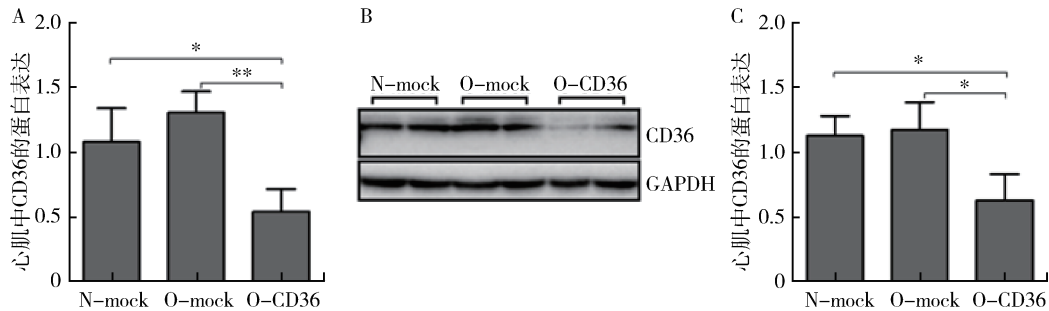


图 3 心肌组织中 CD36 的表达

A. 实时 RT - PCR 提示,肥胖并不引起心肌组织 CD36 的 mRNA 表达增加,心肌内注射慢病毒显著下调了 O - CD36 小鼠心肌 CD36 的 mRNA 表达(每组 $n = 3$);B. Wester blot 法的代表性凝胶图像,以 GAPDH 为内参;C. Wester blot 法的统计结果提示,肥胖并不引起 CD36 蛋白表达增加,RNA 干扰显著下调 O - CD36 小鼠心肌 CD36 的蛋白表达(每组 $n = 3$); $^* P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$

3. 下调 CD36 的表达消除了心肌内中性脂质的过度蓄积:油红 O 染色的结果提示,高脂饮食导致小鼠心肌中性脂质的含量显著增加(1.7 倍),下调心肌

CD36 的表达减少 O - CD36 小鼠心肌中性脂质的含量至正常水平,说明 CD36 在肥胖引起心肌内中性脂质蓄积中起重要作用(图 4)。

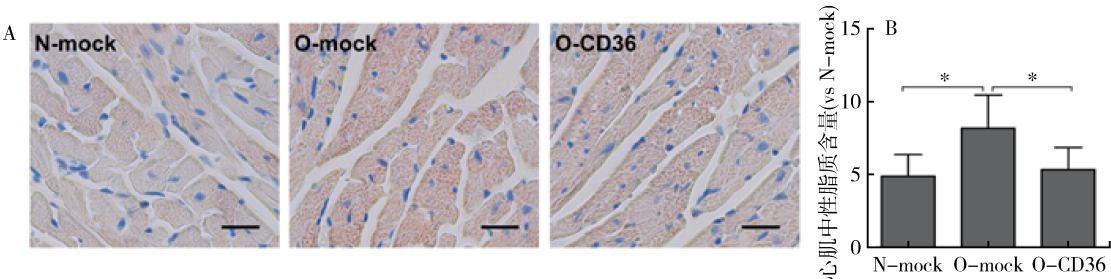


图 4 心肌内中性脂质的含量

A. 小鼠心肌组织油红 O 染色的代表性图片 ($\times 400$),标尺 = $25\mu\text{m}$;B. 心肌油红 O 相对着色面积的统计结果;肥胖显著增加小鼠心肌组织内中性脂质的含量,下调 CD36 的表达消除了肥胖小鼠心肌中性脂质的异常蓄积(每组 $n = 4 \sim 5$,每只小鼠分析 3 张照片); $^* P < 0.01$

4. 下调 CD36 的表达改善了心肌细胞内 ROS 的异常增加:流式细胞术的结果提示,肥胖引起心肌细胞中 ROS 的含量显著增加(1.8 倍),下调心肌 CD36 的表达可改善 ROS 的异常增多,但仍稍高于正常水

平(图 5 中 A、B)。与该结果相似,DHE 染色的结果也提示高脂饮食增加了心肌组织中 ROS 的含量(1.6 倍),而下调心肌 CD36 的表达改善甚至逆转了该进程(图 5 中 C、D)。

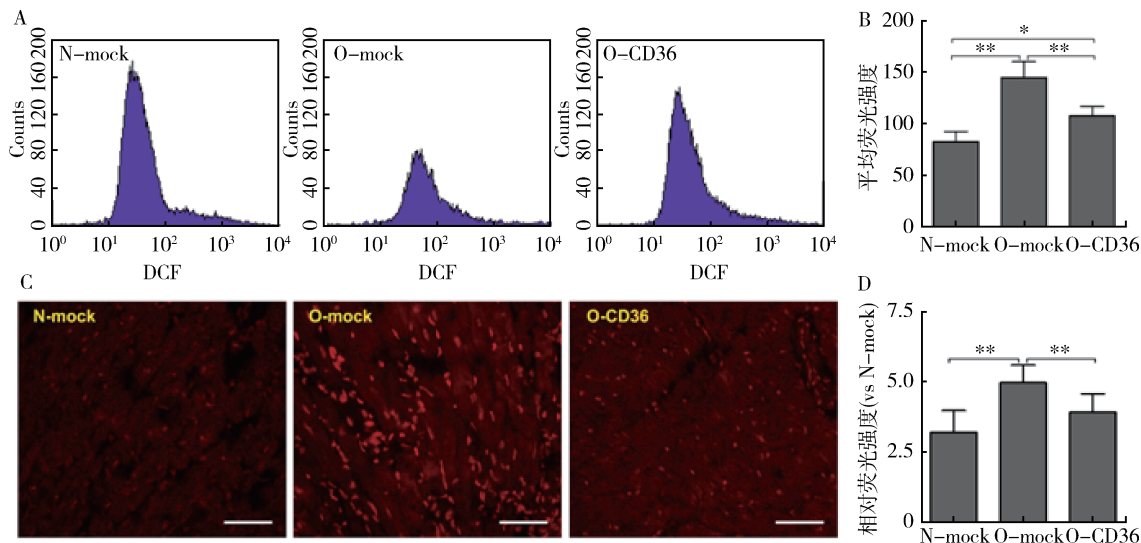


图 5 心肌细胞中 ROS 含量

A. 流式细胞术分析 100,000 个 DCFH-DA 染色的心室肌细胞,检测活细胞的平均荧光强度;B. 流式细胞术检测 ROS 的统计结果(每组 $n=4$)。C. 左心室前壁冷冻切片 DHE 染色的代表性图片($\times 200$),标尺 = $50\mu\text{m}$;D. DHE 染色的统计分析结果(每组 $n=4$,每只小鼠分析 3 张图片),DCFH-DA 和 DHE 均为 ROS 的特异性染料,* $P<0.05$,** $P<0.01$

讨 论

肥胖或糖尿病时,血浆 FA 水平升高,分布于胞质的 CD36 可以永久性地移位至胞膜,介导心肌细胞摄取大量 FA 入胞^[9];而位于线粒体外膜的肉毒碱脂酰转移酶-1b 的表达上调,协助转运更多的 FA 从胞质进入线粒体参与 β 氧化^[12]。此时心肌细胞对 FA 的摄取和利用均显著增强,其能量代谢更多地依赖 FA 氧化供能。尽管如此,FA 摄取的速率仍然超过其 β 氧化的速率,这种供大于需的矛盾最终将导致心肌细胞内 FA 大量增加,并以中性脂质(主要是甘油三酯)的形式沉积于胞质内,后者是引起心肌细胞脂毒性的主要原因^[13]。

ROS 是一类氧的电子还原产物,包括超氧阴离子、过氧化氢和羟自由基等,具有很强的氧化活性。心肌细胞内 ROS 产生的主要部位是线粒体呼吸链的复合物 I 和 III。在正常的线粒体呼吸过程中,少量的电子在未传递到末端氧化酶之前可漏出呼吸链,消耗 O_2 生成 ROS^[14]。生理情况下,机体可通过超氧化物歧化酶等多种机制来中和 ROS,以将其维持在一定的水平,这对机体是必要而有利的。肥胖状态下,线粒体内 FA 的 β 氧化显著增强,促使更多的还原当量

(NADH 和 FADH_2)递呈至电子传递链,抑制后者的电子传递效率。上述变化加速电子经呼吸链漏出,与电子转运黄素蛋白-泛醌氧化还原酶结合而介导更多 ROS 生成,超出机体的清除能力而引起心肌损害^[3]。

本研究旨在通过下调 CD36 表达,减少其所介导的 FA 过量摄取,进而降低心肌细胞内 FA 的 β 氧化率,并观察所加干预对心肌细胞内脂质蓄积和 ROS 含量的影响。心肌组织油红 O 染色的结果提示,高脂饮食小鼠心肌细胞内中性脂质的含量较正常饮食小鼠增加了约 1.7 倍(图 4)。Steinbusch 等^[15]研究高脂饮食 16 周的小鼠也发现了类似水平的心肌脂质沉积增多。通过 RNA 干扰下调心肌 CD36 的表达,本研究中肥胖小鼠心肌组织内的脂质蓄积得以被消除,这个结果多少令人惊讶,因为除外 CD36,心肌细胞还可通过脂肪酰辅酶 A 合成酶 1、脂肪酸转运蛋白 1 等多种酶类摄取 FA。上述结果进一步证实了 CD36 在心肌细胞 FA 代谢中所起的关键作用。

本研究中高脂饮食还引起肥胖小鼠心肌细胞内 ROS 的含量显著增加(两种方法检测分别增加 1.8 倍和 1.6 倍)。通过慢病毒介导的 RNA 干扰下调心

肌 CD36 的表达,改善甚至逆转了这一病理进程(图 5)。上述结果证实,CD36 介导的 FA 高代谢率与心肌细胞内 ROS 过度生成密切相关。相对过量的 ROS 可影响生物膜和其他高分子的结构或功能,从而对心肌组织产生一系列的毒性作用。ROS 既可以直接氧化损伤线粒体,也可以通过引起线粒体解偶联,导致 ATP 生成减少及耗氧量增加^[7, 16]。ATP 生成的减少可能导致心肌能量缺乏,若持续存在而得不到纠正,最终可能引起心肌收缩功能障碍。此外,ROS 还涉及多种病理生理进程,如可诱导内质网应激、钙调控异常、心肌纤维化以及心肌细胞凋亡等^[5, 6, 17]。因此,通过抑制 CD36 的表达来减少 ROS 的过度生成,可能是治疗代谢相关的心肌功能障碍的一种有效策略。

综上所述,CD36 在肥胖引起的心肌内中性脂质蓄积和 ROS 水平升高中起重要作用,CD36 是一个潜在的抗氧化应激及抗心肌代谢重构的重要靶点。

参考文献

- Yumuk V, Tsigos C, Fried M, *et al.* European guidelines for obesity management in adults[J]. *Obe Facts*, 2015, 8(6):402-424
- 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
- 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
- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, *et al.* Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(47):44784-44790
- Fauconier 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
- 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 Res*, 2013, 12:158
- Boudina S, Sena S, O'Neill BT, *et al.* Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity[J]. *Circulation*, 2005, 112(17):2686-2695
- Habets DD, Coumans WA, Voshol PJ, *et al.* Ampk-mediated increase in myocardial long-chain fatty acid uptake critically depends on sarcolemmal cd36[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 355(1):204-210
- 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
- Gao E, Lei YH, Shang X, *et al.* A novel and efficient model of coronary artery ligation and myocardial infarction in the mouse[J]. *Circ Res*, 2010, 107(12):1445-1453
- 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
- 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
- Unger RH, Clark GO, Scherer PE, *et al.* Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1801(3):209-214
- 张素清,姜良铎,徐建兴. 线粒体、活性氧与心肌缺血再灌注损伤[J]. *医学研究杂志*, 2006, 35(9):84-86
- Steinbusch LK, Luiken JJ, Vlasblom R, *et al.* Absence of fatty acid transporter cd36 protects against western-type diet-related cardiac dysfunction following pressure overload in mice[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011, 301(4):E618-627
- Boudina S, Bugger H, Sena S, *et al.* Contribution of impaired myocardial insulin signaling to mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the heart[J]. *Circulation*, 2009, 119(9):1272-1283
- 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
(收稿日期:2016-01-19)
(修回日期:2016-01-25)
- Res, 2008, 14(2):370-378
- Kerlikowske K, Molinaro AM, Gauthier M L, *et al.* Biomarker Expression and Risk of Subsequent Tumors After Initial Ductal Carcinoma In Situ Diagnosis[J]. *Natl Cancer*, 2010, 102(9):627-637
- S Tiwari, R Malik, VK Trichal. Breast Cancer: Correlation of Molecular Classification with Clinicohistopathology[J]. *SJAMS*, 2015, 3(2G):1018-1026
- Williams K, Barnes N, Cheema K, *et al.* Molecular Phenotypes of DCIS predict Invasive and DCIS recurrence[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(5):PD04-PD06
(收稿日期:2015-11-12)
(修回日期:2015-11-23)
- Ferreira EN, Elias EV, Castro N, *et al.* Abstract 452: Comprehensive gene expression analysis identifies molecular markers involved with the progression of ductal carcinoma in situ of the breast[J]. *Cancer Res*, 2014, 74:452
- Castro NP, Osório CA, Torres C, *et al.* Evidence that molecular changes in cells occur before morphological alterations during the progression of breast ductal carcinoma[J]. *Breast Cancer Res*, 2008, 10(5):R87
- Allred DC, Wu Y, Mao S, *et al.* Ductal carcinoma in situ and the emergence of diversity during breast cancer evolution[J]. *Clin Cancer*

(上接第 13 页)