

# rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 转染 HepG2 肝细胞对<sup>125</sup>I-HDL 摄取的调节

孙润陆<sup>1</sup>, 包金兰<sup>1</sup>, 张舒媚<sup>2</sup>, 黄灿霞<sup>1</sup>, 张玉玲<sup>1</sup>

(1.中山大学孙逸仙纪念医院心内科//广东省心电图生理与心律失常重点实验室,广东 广州 510120;

2.清远市人民医院心电图室,广东 清远 511518)

**摘要:**【目的】探讨 B 族 I 型清道夫受体(SR-BI)过表达对高密度脂蛋白(HDL)摄取的调节,为 SR-BI 在胆固醇逆转运(RCT)及动脉粥样硬化(AS)中的研究提供新思路。【方法】用含 SR-BI 基因的重组腺相关病毒 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 杂合载体转染人 HepG2 肝细胞株,Realtime RT-PCR 和 Western Blot 分别检测转染后 SR-BI mRNA 和蛋白的表达。<sup>125</sup>I-HDL 同位素标记观察转染对 HDL 结合的影响。激光共聚焦显微镜观察转染后 SR-BI 细胞分布及转移情况。【结果】与未转染组及对照病毒 rAAV2/1-IRES-EGFP 转染组相比,重组病毒 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 转染组 SR-BI mRNA 水平和蛋白表达显著增加,差别均有统计学意义( $P$  均  $< 0.01$ ),且可以引起 <sup>125</sup>I 标记的 HDL 与 HepG2 肝细胞的结合增加 1.28 倍和 1.40 倍,差别均有统计学意义( $P$  均  $< 0.01$ )。在无血清状态下,我们用激光共聚焦显微镜观察发现 SR-BI 同时位于细胞膜和细胞浆, HDL 可以促进 SR-BI 从细胞浆到细胞表面的转移。【结论】SR-BI 过表达可以增加 HepG2 肝细胞 HDL 的摄取且摄取可能主要发生在细胞膜上, SR-BI 参与了 RCT 的过程。

**关键词:** B 族 I 型清道夫受体;高密度脂蛋白;胆固醇逆转运;HepG2 肝细胞

中图分类号:R541.4

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2016)02-0202-08

## Regulation of rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP Transfection on Uptake of HDL in HepG2 Hepatoma Cells

SUN Run-lu<sup>1</sup>, BAO Jin-lan<sup>1</sup>, ZHANG Shu-mei<sup>2</sup>, HUANG Can-xia<sup>1</sup>, ZHANG Yu-ling<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangdong Province Key Laboratory of Arrhythmia and Electrophysiology, GuangzhouChina, 510120; 2. Department of Electrocardiogram, Qingyuan People's Hospital, Qingyuan 511518, China)

Corresponding to: ZHANG Yu-ling, E-mail: zhangyuling@126.com

**Abstract:**【Objective】 The aim of this study was to investigate the effect of scavenger receptor class B type I (SR-BI) overexpression on the uptake of high density lipoprotein (HDL) and provide a novel thought to research the role of SR-BI in reverse cholesterol transport (RCT) and atherosclerosis (AS). 【Methods】 We adopted recombinant vectors rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP to transfect human HepG2 hepatoma cells. Then, the expressions of SR-BI mRNA and protein were detected by Real-time RT-PCR analysis and Western blot analysis after transfection. HDL was labeled by radioiodination of the protein component using <sup>125</sup>I and radioactivity were measured after transfection. 【Results】 Compared with the control and rAAV2/1-IRES-EGFP transfection group, the expressions of SR-BI mRNA and protein were significantly increased as well as the increasing uptake of <sup>125</sup>I-HDL (by 1.28 and 1.40 times, respectively) after rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP transfection ( $P < 0.05$ ). RAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP was found distributed both in the cytoplasm and cell membrane in serum-starved cells. However, HDL resulted in a marked redistribution of the bulk of rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP to the cell surface. 【Conclusion】 SR-BI overexpression increases the uptake of HDL in HepG2

收稿日期:2015-11-17

基金项目:广东省自然科学基金(2014A030313712)

作者简介:孙润陆,研究生在读,研究方向:心血管病学专业,E-mail:sunrunlu@126.com;张玉玲,通信作者,副教授,硕士生导师,心血管病学,E-mail:zhangyuling@126.com

hepatoma cells, which might occur in the cell surface. Thus, the overexpression of SR-BI gene could increase the RCT pathway by promoting cholesterol ester uptake from plasma HDL.

**Key words:** Scavenger receptor class B type I; high density lipoprotein; reverse cholesterol efflux; human HepG2 hepatoma cells

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2016, 37(2): 203-209]

冠心病的发病率和死亡率是发达国家和大多数发展中国家的首要病因。AS 是冠心病的主要病理基础,血脂代谢异常是 AS 发生的主要的危险因素之一<sup>[1]</sup>。大量流行病学、基础与临床研究均表明,血浆中高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平与 AS 的发病呈负相关<sup>[2-5]</sup>。他汀类药物使心血管疾病下降了 30%以上,但是即使 LDL-C 降至极低的水平,残余心血管疾病危险仍然存在<sup>[6-8]</sup>。因此 HDL-C 的研究成为冠心病预防与治疗的重要靶点。HDL-C 具有抗 AS 作用,被称为“好胆固醇”。近年来的研究表明,HDL 的抗 AS 作用主要基于 HDL 参与的 RCT 过程。肝脏表面的 SR-BI 在 RCT 过程中起关键作用,在 SR-BI 基因过表达的小鼠中,血浆中胆固醇浓度降低,动脉粥样硬化斑块面积减少,因此 SR-BI 被认为是预防和治疗 AS 的最有潜力的新靶位之一<sup>[8-9]</sup>。在肝脏中,SR-BI 主要参与 HDL 胆固醇酯的选择性摄取,进而清除血浆中的胆固醇酯。因此,如何增加 HDL 与 SR-BI 的结合,增加 RCT,达到抗 AS 目的成为目前最有潜力的研究方向。此外,研究表明在偏振肝细胞中,SR-BI 主要位于细胞膜的顶部或基底部分,具有细胞内吞作用<sup>[10-12]</sup>;但是,也有一些研究表明选择性脂蛋白摄取并不依赖于 SR-BI 的内吞作用,脂蛋白的摄取主要发生在细胞膜<sup>[13-14]</sup>。因此 SR-BI 在肝细胞中的分布及转移过程尚无很好的解释。本研究拟通过已构建成功的携带 SR-BI 基因的重组腺相关病毒载体 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 转染人 HepG2 肝细胞株,观察其对 HDL 脂蛋白摄取的影响及 SR-BI 在肝细胞中分布及转移情况。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP: 为携带 SR-BI 基因并具有绿色荧光蛋白标记的重组腺相关病毒载体,病毒滴度约  $1.5 \times 10^{12}$  vg/mL; rAAV2/1-IRES-EGFP: 为携带绿色荧光蛋白基因的腺相关

病毒 2/1 杂合载体,购自本元正阳基因有限公司,病毒滴度约  $2.0 \times 10^{12}$  vg/mL; 人 HepG2 肝细胞株购自 ATCC (ATCC 号 HB-8065<sup>TM</sup>; 1640 细胞基础培养基和胎牛血清购自 GIBCO 公司; SR-BI Realtime RT-PCR 引物及试剂盒购自 Takara 公司; 兔抗人 SR-BI 多克隆抗体购自 abcom 公司; Human Plasma HDL 购自 Calbiochem (No.437641)。

### 1.2 人 HepG2 肝细胞株的培养

冻存细胞放入 37 °C 水浴中使其尽快融化,移入无菌离心管,加入含 100 mL/L 胎牛血清的 1640 培养基,以 1 000 r/min,半径为 8 cm,离心 5min,弃上清,以  $1 \times 10^6$  的密度接种于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中,于 37 °C 体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育。当细胞 80% 融合时,用含 0.02% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,以等量的含 100 mL/L 胎牛血清的 1640 培养基中和胰蛋白酶,离心 5 min (1 000 r/min),弃上清,混匀,接种于 2 ~ 3 个新培养瓶中,加足培养液,置于培养箱中孵育,传代完成。

### 1.3 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 转染 HepG2 肝细胞

前期已成功构建 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP<sup>[15]</sup>。取生长状态良好的细胞消化后接种到 24 孔板 ( $1 \times 10^5$  细胞/孔)。当细胞 60% 融合时,按预先探索的最适 MOI (vg/cells) 值  $1 \times 10^5$  vg/cells 进行病毒转染。将含病毒的无血清 1640 培养基分别滴加至各孔,每孔的液体总量为 200  $\mu$ L。充分摇匀,置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的孵箱中培养,每 25 min 取出摇匀 1 次。6 h 后吸出病毒液,加入含 100 mL/L 胎牛血清的 1640 培养基,常规培养,隔天换液,待细胞达到 80% 融合时传代。

### 1.4 Realtime RT-PCR 检测转染后 SR-BI mRNA 在 HepG2 肝细胞中的表达

细胞转染后,常规提取 RNA 紫外分光光度计检测  $A_{260}/A_{280}$  比值,测定 RNA OD 值并计算 RNA 加样量。逆转录反应第一步反应体系:在 DEPC 处理过的 1.5 mL EP 管中加入总 RNA 样品 2  $\mu$ L 和

Oligo(dT)18Primer 1  $\mu\text{L}$ (0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), dNTP Mixture 1  $\mu\text{L}$ , 加入 DEPC 水使总体积为 10  $\mu\text{L}$ 。瞬时离心混匀后置 PCR 仪中以 65  $^{\circ}\text{C}$  反应 5 min, 迅速置于冰上。第二步反应体系: 按次序分别加入下列试剂, 瞬时离心混匀: 上述反应液 10.0  $\mu\text{L}$ , 15 $\times$  PrimeScript™ Buffer 4.0  $\mu\text{L}$ , RNase Inhibitor (40 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , Prime Script™ RNase (2 step), 0.5  $\mu\text{L}$ , DEPC 处理水 5.0  $\mu\text{L}$ , 总体积 20.0  $\mu\text{L}$ 。置 PCR 仪中以 42  $^{\circ}\text{C}$  反应 60 min, 继以 95  $^{\circ}\text{C}$  反应 5 min 以灭活 M-MLV。设计 Real-time PCR 引物 Homo SR-BI (GeneID 949)F primer 5' CAGGATAAGGAGGCC ATTCA3', R primer 5' GGCTCACAGGCCATTAGAA 3'。按常规加完 20  $\mu\text{L}$  体系后, 上机。反应结束后由计算机根据反应过程中产生的荧光信号进行数据处理并绘制扩增曲线, 自动计算出 Ct 值 (Threshold Cycle), 然后计算出  $\Delta\Delta\text{C}_T$  值、 $\Delta\Delta\text{C}_T$  值及  $2^{-\Delta\Delta\text{C}_T}$  值。

### 1.5 Western Blot 检测转染后 SR-BI 蛋白在 HepG2 肝细胞中的表达

生长状态良好的 HepG2 肝细胞转染病毒后, 常规提取总蛋白, 100  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min, BCA 法测取蛋白浓度。取 20  $\mu\text{g}$  细胞蛋白样品加入 SDS-PAGE 凝胶加样孔中进行电泳分离, 以 15 ~ 20 mA、200 V 稳流电流, 电泳 45 min, 待样品过浓缩胶后, 以 120 V 电泳 90 min, 停止。将凝胶分离的蛋白提取物转移至硝酸纤维膜上, 转膜 2 h。结束后, 取出膜置于封闭液 (5% 脱脂奶粉 PBS 缓冲液) 中, 室温浸泡 2 h。封闭完成后, 加入 1:1000 (5% 脱脂奶粉 PBS 缓冲液稀释) 兔抗人 SR-BI 多克隆抗体, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。弃去一抗, PBST 清洗 5 min  $\times$  3 次, 加入 1:200 (5% 脱脂奶粉 PBS 缓冲液稀释) 辣根酶标记山羊抗兔 IgG 二抗, 室温反应 1 h。弃去二抗, PBS 清洗 5 min  $\times$  3 次。压片法曝光显影。最后, 将图片扫描后用全自动凝胶图像处理系统分析目标条带的净光密度值。

### 1.6 $^{125}\text{I}$ -HDL 的制备 (Iodogen 法) 及 $^{125}\text{I}$ -HDL 与 SR-BI 结合实验

1.6.1  $^{125}\text{I}$ -HDL 的制备 (Iodogen 法) Iodogen 管 (含氧化剂 Iodogen 25  $\mu\text{g}$ ) 中加入 HDL 2 mg、0.2 mol/L PB (磷酸缓冲液, pH 7.4) 100 mL、Na  $^{125}\text{I}$  3.0  $\times 10^7$  Bq, 室温下反应 10 min, 用 PBS 将反应液稀释到 2.4 mL, 加入 5% 的 KI 溶液 100 mL, 纸层析检测碘标记率 (展开剂: 5% 的三氯乙酸), 混匀后

过 PD 柱 (Sephadex G-25, Pharmacia 产品), 放弃 2.5 mL 的洗出液后开始搜集洗出液, 每毫升一管, 检测各管的放射性强度, 并按上述纸层析检测各管的放射化学纯度。

1.6.2  $^{125}\text{I}$ -HDL 与 SR-BI 结合实验 取生长状态良好的 HepG2 肝细胞接种到 6 孔板, 以最佳 MOI 值分别转染重组病毒 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 及对照病毒 rAAV2/1-IRES-EGFP, 并设未转染的 HepG2 肝细胞作为对照组。转染 72 h 后, 吸去培养基, 应用 PBS 清洗 3 次。分别加入终浓度为 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $^{125}\text{I}$ -HDL 培养基 1 mL, 同时加入非标记的 HDL 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  作为空白对照; 细胞于 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h; 弃去培养基, 应用预冷含 2 g/L BSA 的 Tris-Buffer 快速洗涤 3 次。应用预冷无 BSA 的 Tris-Buffer 洗涤 2 次, 每次 5 min。加入 0.2 mol/L NaOH 0.5 mL 裂解液, 室温摇床上裂解 3 ~ 4 h。搜集细胞裂解液,  $\gamma$  放射测定仪进行计数。

### 1.7 激光共聚焦显微镜观察 SR-BI 动态转移

取生长状态良好的 HepG2 肝细胞接种到放入灭菌盖玻片的 6 孔板中, 用重组病毒 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 以最佳 MOI 值转染 HepG2 肝细胞 72 h 后, 吸去培养基, 加入无血清 1640 培养基 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 3 h; 吸去无血清培养基, 加入 HDL 于 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 45 min。PBS 清洗已爬好盖玻片的 6 孔板 5 min  $\times$  3 次, 40 g/L 多聚甲醛液 (用 PBS 新鲜配制) 室温固定 20 min。避光, 应用 PBS 清洗 5 min  $\times$  3 次。加入 1:300 (用 PBS 新鲜配制) DAPI, 室温避光 5 min。避光, 应用 PBS 清洗 5 min  $\times$  3 次。免疫荧光封片剂封片, 室温过夜。用 Zeiss LSM-510 共聚焦显微镜进行观察。

### 1.8 统计分析

用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。数据采用均数  $\pm$  标准差表示, 多组间均数的比较用单因素方差分析, 有统计学意义者用 LSD 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 RT-PCR 检测转染后 SR-BI mRNA 在 HepG2 肝细胞中的表达

以最佳感染复数  $1 \times 10^5$  转染 HepG2 肝细胞, 应用  $2^{-\Delta\Delta\text{C}_T}$  方法计算 SR-BI mRNA 的表达, 结果显示在携带目的基因的重组病毒 rAAV2/1-SR-BI-

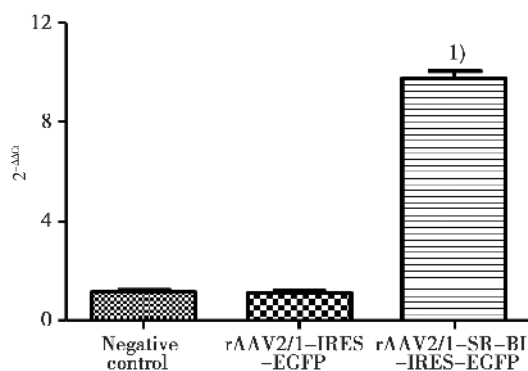
表 1 RT PCR 检测转染 72 h 后 SR-BI mRNA 在 HepG2 肝细胞中的表达

Table 1 The expression of SR-BI mRNA tested by RT PCR in HepG2 hepatoma cells after transfection 72 h

	Control		rAAV2/1-IRES-EGFP		rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP	
	SR-BI	18sr-RNA	SR-BI	18sr-RNA	SR-BI	18sr-RNA
Ct value	21.36 ± 0.28	7.94 ± 0.45	21.7 ± 0.26	8.53 ± 0.38	20.88 ± 0.27	12.29 ± 0.33
$\Delta$ Ct	13.41 ± 0.53	-	13.18 ± 0.46 <sup>3)</sup>	-	10.11 ± 0.43 <sup>1)2)</sup>	-
$\Delta\Delta$ Ct	-	-	-0.24 ± 0.70	-	-3.96 ± 0.62	-
2 <sup>-<math>\Delta\Delta</math>Ct</sup>	-	-	1.18	-	9.78	-

1), 2)  $P < 0.01$  vs control and rAAV2/1-IRES-EGFP group respectively; 3)  $P > 0.01$  vs control group. Ct= Threshold Cycle, hSR-BI CT=hSR-BI Mean CT-18sr-RNA Mean CT, Sample CT=Sample CT-Sample Control CT, The experiment was performed by three times ( $n = 3$ ).

IRES-EGFP 转染组较未转染组 SR-BI mRNA 的表达增加 9.78 倍。将 3 组的  $\Delta$ Ct 值应用单因素的方差分析显示:与未转染组及对照病毒 rAAV2/1-IRES-EGFP 转染组相比,重组病毒 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 转染组 SR-BI mRNA 表达较高且差异有统计学意义,  $P$  值分别为 0.0021 及 0.0064; 与未转染组相比, 对照病毒 rAAV2/1-IRES-EGFP 转染组 SR-BI mRNA 表达差异无统计学意义 ( $P = 0.7853$ , 表 1, 图 1)。



1)  $P < 0.01$  vs control and rAAV2/1-IRES-EGFP group respectively; the experiment was performed by three times ( $n = 3$ )

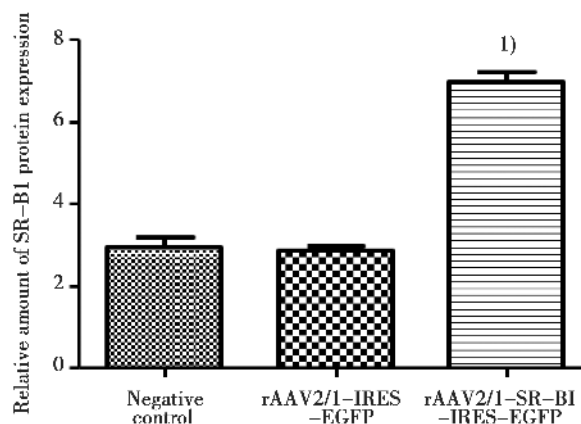
图 1 Realtime PCR 检测转染 72 h 后 SR-BI mRNA 在 HepG2 肝细胞中的表达

Fig.1 The expression of SR-BI mRNA tested by RT PCR in HepG2 hepatoma cells after transfection 72 h

## 2.2 Western Blot 检测转染后 SR-BI 蛋白在 HepG2 肝细胞中的表达

Western Blot 结果显示,未转染组及对照病毒 rAAV2/1-IRES-EGFP 转染组 HepG2 肝细胞均有少量 SR-BI 蛋白的表达,而重组病毒 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 转染组 SR-BI 蛋白的表达明

显增加,分别增加 84.3%和 90.2%,且差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ , 图 2)。



1)  $P < 0.01$  vs control and rAAV2/1-IRES-EGFP group respectively. The experiment was performed by three times ( $n = 3$ ).

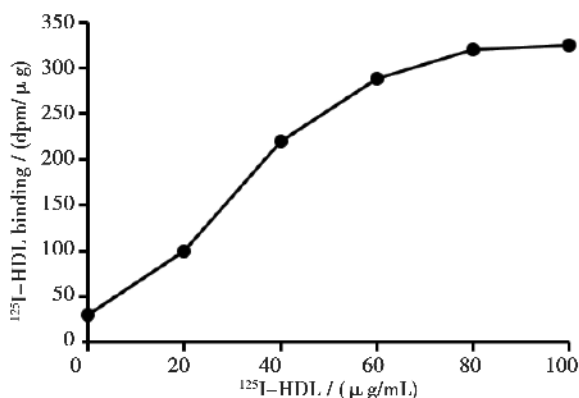
图 2 Western Blot 检测转染后 SR-BI 蛋白在 HepG2 肝细胞中的表达

Fig.2 The expression of SR-BI protein tested by Western blot in HepG2 liver cell after transfection of rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP for 72 h

## 2.3 <sup>125</sup>I-HDL 同位素标记观察 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 转染对 HDL 结合的影响

应用 Iodogen 法行 <sup>125</sup>I-HDL 同位素标记结果显示:标记率为 65.8%,放射化学纯度 96.1%,放射性比活度  $1.0 \times 10^9$  Bq/mg  $\approx 6.0 \times 10^5$  dpm/ $\mu$ g。

首先以未转染的 HepG2 肝细胞分别加入终浓度为 20、40、60、80、100  $\mu$ g/mL <sup>125</sup>I-HDL,测定 <sup>125</sup>I-HDL 浓度,由图 3 可见在细胞数量固定时,随着 <sup>125</sup>I-HDL 浓度的增加,与 HepG2 的结合量也增加,<sup>125</sup>I-HDL 浓度于 60  $\mu$ g/mL 时逐渐进入平台期。



The experiment was performed by three times ( $n = 3$ ).

图 3  $^{125}\text{I}$  标记的 HDL 与 HepG2 肝细胞的结合曲线

Fig.3 Binding curve of  $^{125}\text{I}$ -HDL and HepG2 hepatoma cells

以最佳感染复数  $1 \times 10^5$  转染 HepG2 肝细胞, 72 h 后测定  $^{125}\text{I}$ -HDL 与 HepG2 肝细胞的结合, 与未转染组及对照病毒 rAAV2/1-IRES-EGFP 转染组相比, 重组病毒 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 转染组  $^{125}\text{I}$ -HDL 的结合增加 1.28 和 1.40 倍, 且差异有统计学意义,  $P$  值均  $< 0.01$ ; 与未转染组相比, 对照病毒 rAAV2/1-IRES-EGFP 转染组  $^{125}\text{I}$ -HDL 脂蛋白的结合差异无统计学意义 ( $P > 0.01$ ; 表 2, 图 4)。

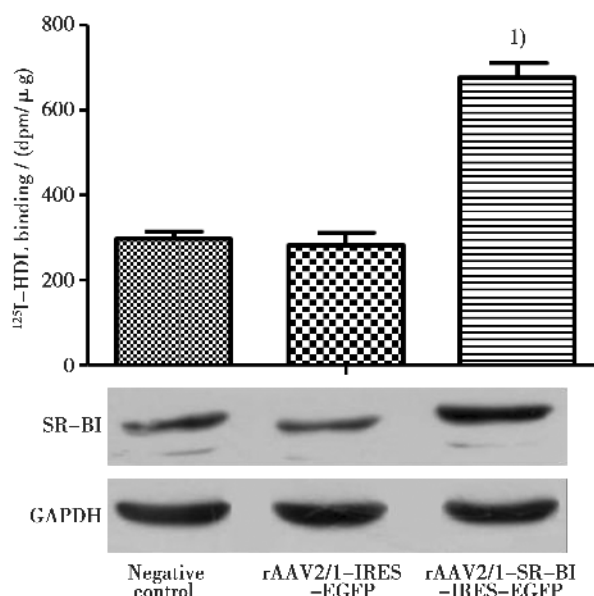
#### 2.4 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 转染后 HDL 促进 SR-BI 由细胞浆到细胞膜的转移

前期研究已经证明重组病毒 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 可以使 SR-BI 基因及蛋白表达增强并在荧光显微镜显示绿色荧光。为了进一步研究 SR-BI 在细胞内分布, 转染 HepG2 肝细胞 72 h 后, HDL 处理细胞 45 min, 我们用激光共聚焦显微镜观察 SR-BI 在 HepG2 肝细胞表面的分布。结果发现, 在无血清状态下 SR-BI 在 HepG2 肝细胞浆和肝细胞膜均有分布, HDL 可以促进 SR-BI 从细胞浆到细胞表面的转移, 继之可以引起 HDL 脂蛋白摄取的增加。提示 SR-BI 介导的摄取过程可能主要发生在细胞膜上(图 5)。

表 2 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 对  $^{125}\text{I}$  标记的 HDL 与 HepG2 肝细胞结合的影响

Group ( $n = 5$ )	Control	rAAV2/1-IRES-EGFP	rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP	$F$	$P$
$^{125}\text{I}$ -HDL binding/(dpm/ $\mu\text{g}$ )	$296.4 \pm 16.12$	$281.6 \pm 29.67$	$676.6 \pm 32.14^{1)2)}$	346.16	$< 0.001$

1)2)  $P < 0.01$  vs control and rAAV2/1-IRES-EGFP group respectively. The experiment was performed by five times ( $n = 5$ ).



1)  $P < 0.01$  vs control and rAAV2/1-IRES-EGFP group respectively. The experiment was performed by five times ( $n = 5$ )

图 4 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 对  $^{125}\text{I}$  标记的 HDL 与 HepG2 肝细胞结合的影响

Fig.4 Effect of rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP on  $^{125}\text{I}$ -HDL protein uptake in HepG2 hepatoma cells

### 3 讨论

1977 年 Framingham<sup>[2]</sup> 研究证明高 LDL-C 和低 HDL-C 水平是心血管疾病发病的两个独立危险因素; 而且低 HDL-C 水平还是代谢综合征的重要组成部分<sup>[16]</sup>, 研究表明 HDL-C 每升高 10 mg/L, 心血管事件危险下降 6%。此外, 研究还发现 HDL-C  $< 400$  mg/L 与严重冠心病危险、PTCA 术后再狭窄及冠心病死亡相关<sup>[17-18]</sup>。

SR-BI 为 82ku 的糖基化跨膜蛋白, 可以在不同的组织中表达, 其中表达最高的部位是 HDL 选择性脂蛋白摄取的肝脏及类固醇组织<sup>[12, 19]</sup>。SR-BI 是第一个在分子水平上得到证实的 HDL 受体, 参与并介导了 RCT 过程。RCT 指细胞内多余的胆固

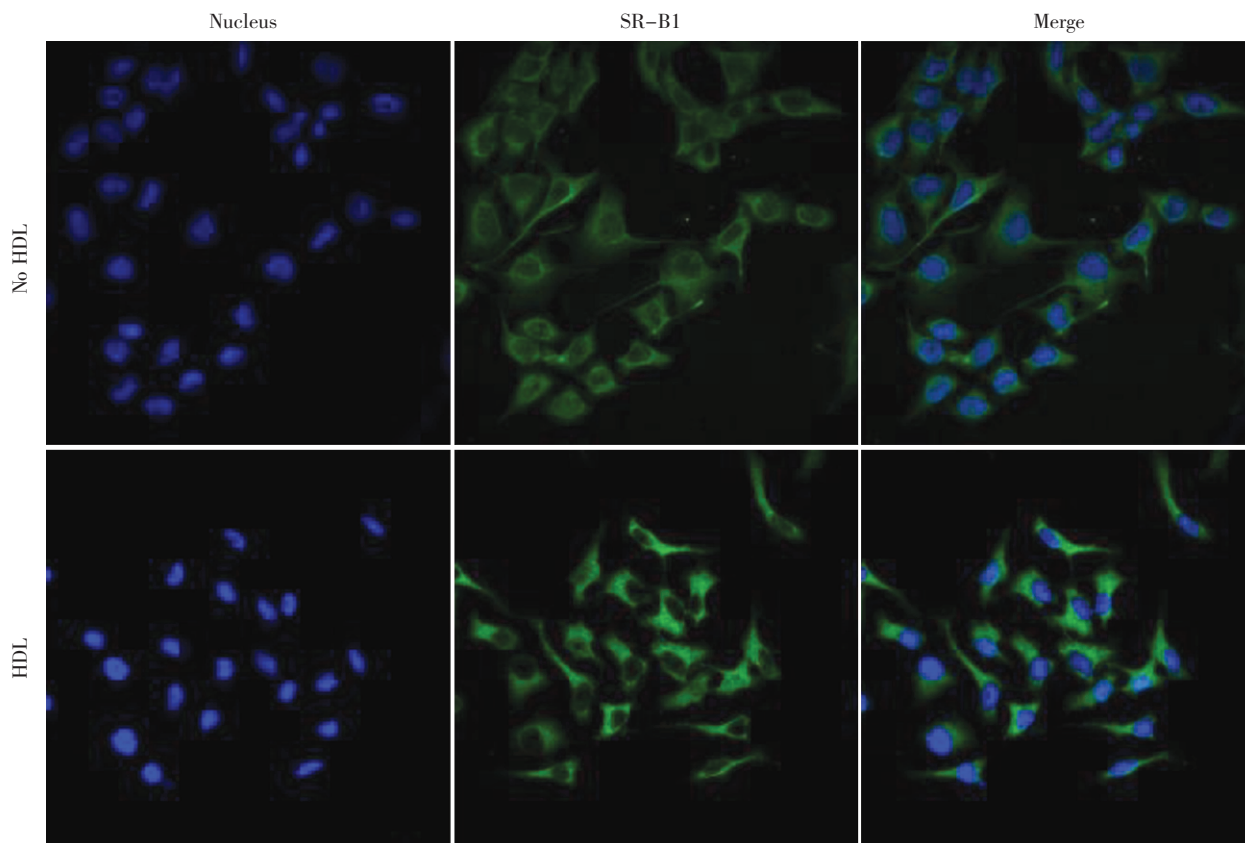


图 5 激光共聚焦显微镜观察 rAAV-SR-BI-IRES-EGFP 转染后 HDL 促进 SR-BI 由细胞浆到细胞膜的转移( $\times 20$ )

Fig.5 HDL mediated the redistribution from the cytoplasm to cell membrane after rAAV-SR-BI-IRES-EGFP transfection by confocal microscope( $\times 20$ )

醇从周边组织流出与 HDL 结合并将其酯化后,以 HDL 胆固醇酯的形式转运到肝脏,与肝脏表面的 SR-BI 特异性结合,然后从肝脏分泌至胆管,最后从粪便排出<sup>[20]</sup>。

大量的体内外研究均表明 SR-BI 与 HDL 的代谢相关<sup>[21]</sup>,如在肝脏过度表达 SR-BI 可以引起血浆 HDL 胆固醇浓度的下降、HDL 胆固醇酯的清除增加及胆固醇自肝脏转移至胆汁,胆汁中胆固醇的含量增加<sup>[22-24]</sup>。应用 SR-BI 基因敲除的小鼠或减弱 SR-BI 的表达则表现出血浆 HDL 胆固醇浓度增加<sup>[25]</sup>。SR-BI 参与的 HDL 胆固醇酯的选择性摄取可分两部分:第一步为 HDL 结合 SR-BI 的胞外部分,HDL 中的胆固醇酯以一种叫做“选择性摄取”的途径进入细胞内。SR-BI 与 HDL 结合后,核心的胆固醇酯进入细胞而不伴随着整个 HDL 颗粒的摄取和降解;第二步为胆固醇酯选择性转移到细胞内以合成胆汁酸、类固醇激素等,而失去胆固醇酯的 HDL 剩余颗粒重新进入循环<sup>[26-27]</sup>。

本研究发现随着  $^{125}\text{I}$ -HDL 浓度的增加,HDL 与 HepG2 肝细胞的结合量也增加, $^{125}\text{I}$ -HDL 浓度于  $60 \mu\text{g}/\text{mL}$  时结合率达到最大并逐渐进入平台期。rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 转染 HepG2 肝细胞使 SR-BI 表达增加,可以引起  $^{125}\text{I}$ -HDL 与 HepG2 肝细胞的结合增加。上述结果提示,SR-BI 过表达可以增加 HDL 结合,进而增加 HDL 胆固醇酯“选择性摄取”进入细胞内,SR-BI 参与了 RCT 的过程。

SR-BI 在细胞膜上的结构如马蹄样,由 5 个域构成,对于 HDL-C 的选择性摄取十分重要<sup>[28]</sup>。我们的研究证明在无血清状态下 SR-BI 同时位于细胞膜和细胞浆,HDL 可以促进 SR-BI 从细胞浆到细胞表面的转移,继之引起 HDL 脂蛋白摄取的增加。提示在肝脏细胞中,SR-BI 过表达增加 HDL 摄取主要发生在细胞膜上。相关研究表明<sup>[8]</sup>,SR-BI 为一跨膜蛋白,SR-BI 可能通过磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol3-kinase, PI3K)通路的调

节,PI3K 可能参与了细胞膜的转运过程,包括细胞膜的调节蛋白和胞内受体的摄取与再循环。

HDL 受体 SR-BI 的发现和生理特性为人们在胆固醇和脂蛋白的代谢的研究提供了新思路,对于 SR-BI 功能和机制的研究不仅对研究 HDL 复杂的代谢具有重要意义,同时对于冠心病、心力衰竭的研究也具有重要意义。许多关于人类 SR-BI 基因多态性和脂蛋白代谢相关性的研究均提示 SR-BI 在人体脂蛋白的代谢过程可能也担任了重要角色,但是 SR-BI 在人体的生理及病理意义还需要更多的研究来证实。

#### 参考文献

- [1] BROWN MS, GOLDSTEIN JL. Expression of the familial hypercholesterolemia gene in heterozygotes: mechanism for a dominant disorder in man[J]. *Science*, 1974, 185(4145): 61-63.
- [2] CASTELLI WP, GARRISON RJ, WILSON PW, et al. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study[J]. *JAMA*, 1986, 256(20): 2835-2838.
- [3] GANDA A, MAGNUSSON M, YVAN-CHARVET L, et al. Mild renal dysfunction and metabolites tied to low HDL cholesterol are associated with monocytes and atherosclerosis[J]. *Circulation*, 2013, 127(9): 988-996.
- [4] GRUNDY SM, CLEEMAN JI, DANIELS SR, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement[J]. *Circulation*, 2005, 112(17): 2735-2752.
- [5] FORD ES, GILES WH, DIETZ WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey[J]. *JAMA*, 2002, 287(3): 356-359.
- [6] LAROSA JC, GRUNDY SM, WATERS DD, et al. Intensive lipid lowering with atorvastatin in patients with stable coronary disease [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(14): 1425-1435.
- [7] FORRESTER JS, MAKKAR R, SHAH PK. Increasing high-density lipoprotein cholesterol in dyslipidemia by cholesteryl ester transfer protein inhibition: an update for clinicians [J]. *Circulation*, 2005, 111(14): 1847-1854.
- [8] HUANG CX, ZHANG YL, WANG JF, et al. MCP-1 impacts RCT by repressing ABCA1, ABCG1, and SR-BI through PI3K/Akt posttranslational regulation in HepG2 cells[J]. *J Lipid Res*, 2013, 54(5): 1231-1240.
- [9] KRIEGER M, KOZARSKY K. Influence of the HDL receptor SR-BI on atherosclerosis [J]. *Curr Opin Lipidol*, 1999, 10(6): 491-497.
- [10] ECKHARDT ER, CAI L, SUN B, et al. High density lipoprotein uptake by scavenger receptor SR-BII [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(14): 14372-14381.
- [11] BURGOS PV, KLATTENHOFF C, DE LA FUENTE E, et al. Cholesterol depletion induces PKA-mediated basolateral-to-apical transcytosis of the scavenger receptor class B type I in MDCK cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(11): 3845-3850.
- [12] SILVER DL, WANG N, XIAO X, et al. High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class B type I results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(27): 25287-25293.
- [13] HARDER CJ, VASSILIOU G, MCBRIDE HM, et al. Hepatic SR-BI-mediated cholesteryl ester selective uptake occurs with unaltered efficiency in the absence of cellular energy[J]. *J Lipid Res*, 2006, 47(3): 492-503.
- [14] NIELAND T J, EHRlich M, KRIEGER M, et al. Endocytosis is not required for the selective lipid uptake mediated by murine SR-BI[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1734(1): 44-51.
- [15] 张玉玲, 伍卫, 周淑娴, 等. 重组人高密度脂蛋白 B 族 I 型清道夫受体基因腺相关病毒血清型 2/1 杂合载体在 HepG2 肝细胞的表达[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2009, 30(6): 696-701.  
ZHANG YL, WU W, ZHOU SX, et al. Expression of Adeno-associated Virus Vector Serotype 2/1 Containing Human Scavenger Receptor Class B Type I Gene and Its Expression in HepG2 Hepatoma Cells [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2009, 30(6): 696-701.
- [16] COFFMAN E, RICHMOND-BRYANT J. Multiple biomarker models for improved risk estimation of specific cardiovascular diseases related to metabolic syndrome: a cross-sectional study[J]. *Popul Health Metr*, 2015, 13: 7.
- [17] CHAPMAN MJ, ASSMANN G, FRUCHART JC, et al. Raising high-density lipoprotein cholesterol with reduction of cardiovascular risk: the role of nicotinic acid—a position paper developed by the European Consensus Panel on HDL-C [J]. *Curr Med Res Opin*, 2004, 20(8): 1253-1268.
- [18] GORDON DJ, RIFKIND BM. High-density lipoprotein—

- the clinical implications of recent studies [J]. *N Engl J Med*, 1989, 321(19): 1311-1316.
- [19] LEIVA A, VERDEJO H, BENITEZ ML, et al. Mechanisms regulating hepatic SR-BI expression and their impact on HDL metabolism [J]. *Atherosclerosis*, 2011, 217(2): 299-307.
- [20] ROSENSON RS, BREWER HJ, DAVIDSON WS, et al. Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport [J]. *Circulation*, 2012, 125(15): 1905-1919.
- [21] HOEKSTRA M, VAN BERKEL TJ, VAN ECK M. Scavenger receptor BI: a multi-purpose player in cholesterol and steroid metabolism [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(47): 5916-5924.
- [22] KENT P, STYLIANOU IM. Scavenger receptor class B member 1 protein: hepatic regulation and its effects on lipids, reverse cholesterol transport, and atherosclerosis [J]. *Hepat Med*, 2011, 3: 29-44.
- [23] KOZARSKY KF, DONAHEE H, RIGOTTI A, et al. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels [J]. *Nature*, 1997, 387(6631): 414-417.
- [24] UEDA Y, ROYER L, GONG E, et al. Lower plasma levels and accelerated clearance of high density lipoprotein (HDL) and non-HDL cholesterol in scavenger receptor class B type I transgenic mice [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(11): 7165-7171.
- [25] RIGOTTI A, TRIGATTI BL, PENMAN M, et al. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(23): 12610-12615.
- [26] SHAH PK, KAUL S, NILSSON J, et al. Exploiting the vascular protective effects of high-density lipoprotein and its apolipoproteins: an idea whose time for testing is coming, part I [J]. *Circulation*, 2001, 104(19): 2376-2383.
- [27] MEYERS CD, KASHYAP ML. Pharmacologic elevation of high-density lipoproteins: recent insights on mechanism of action and atherosclerosis protection [J]. *Curr Opin Cardiol*, 2004, 19(4): 366-373.
- [28] VINALS M, XU S, VASILE E, et al. Identification of the N-linked glycosylation sites on the high density lipoprotein (HDL) receptor SR-BI and assessment of their effects on HDL binding and selective lipid uptake [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(7): 5325-5332.

(编辑 徐杰)

(上接第 201 页 from page 201)

- 48-58.
- [9] WANG X, SON YO, CHANG Q, et al. NADPH oxidase activation is required in reactive oxygen species generation and cell transformation induced by hexavalent chromium [J]. *Toxicol Sci*, 2011, 123(2): 399-410.
- [10] HEO KS, FUJIWARA K, ABE J. Glucagon-like peptide-1 and its cardiovascular effects [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2012, 14(5): 422-428.
- [11] GORIN Y, BLOCK K. Nox as a target for diabetic complications [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2013, 125(8): 361-382.
- [12] DHARMALINGAM M. Efficacy and tolerability of GLP-1 agonists in patients with type 2 diabetes mellitus: an Indian perspective [J]. *Ther Adv Endocrinol Metab*, 2014, 5(6): 159-165.
- [13] WU L, WANG D, XIAO Y, et al. Endoplasmic reticulum stress plays a role in the advanced glycation end product-induced inflammatory response in endothelial cells [J]. *Life Sci*, 2014, 110(1): 44-51.
- [14] SCIOLI MG, BIELLI A, AGOSTINELLI S, et al. Antioxidant treatment prevents serum deprivation- and TNF- $\alpha$ -induced endothelial dysfunction through the inhibition of NADPH oxidase 4 and the restoration of  $\beta$ -oxidation [J]. *J Vasc Res*, 2014, 51(5): 327-337.
- [15] KRASNER NM, IDO Y, RUDERMAN NB, et al. Glucagon-Like peptide-1 (GLP-1) analog liraglutide inhibits endothelial cell inflammation through a calcium and AMPK dependent mechanism [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97554.

(编辑 王晓鹰)