

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

张玉玲¹, 伍 卫^{2*}, 周淑娴¹, 雷 娟¹

(中山大学 1. 附属第二医院心血管内科, 广东 广州 510120; 2. 附属第五医院心血管内科, 广东 珠海 519000)

摘要:【目的】构建含绿色荧光蛋白(EGFP)重组人高密度脂蛋白 B 族 I 型清道夫受体(SR-BI)基因腺相关病毒(rAAV)2/1 杂合载体, 观察其在 HepG2 肝细胞的表达。【方法】以 pCMV.SPORT6-SR-BI 质粒为模板 PCR 扩增目的基因 cDNA, 将其克隆至 pSNAV2.0-IRES-EGFP-LacZa 载体中, 经酶切及测序鉴定后, 脂质体介导转染 BHK21 细胞, 经 G418 筛选得到含 SR-BI 基因的 BHK/SR-BI-IRES-EGFP 载体细胞株, 用携带 rep2-cap1 基因的辅助病毒(rHsv/r2cl)感染该细胞株。通过细胞孵育、裂解和病毒纯化, 得到杂合载体 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 病毒。免疫荧光显微镜检测绿色荧光表达, 计算转染效率, Western Blot 检测转染后 SR-BI 蛋白的表达。【结果】酶切鉴定表明 pSNAV2.0-SR-BI-IRES-EGFP 重组成功, 基因测序显示装入 pSNAV2.0-IRES-EGFP-LacZa 质粒中的 SR-BI 基因正确; 成功构建了 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 病毒载体。转染 HepG2 肝细胞后免疫荧光显微镜检测最佳 MOI 值为 1×10^5 时, 以此值转染 HepG2 肝细胞荧光高效表达; Western Blot 检测未转染组及 rAAV2/1-IRES-EGFP 组 HepG2 肝细胞均有 SR-BI 蛋白表达, rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 组 SR-BI 蛋白表达水平较 rAAV2/1-IRES-EGFP 组及未转染组显著增加。【结论】成功构建了 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 杂合载体系统, 转染后 SR-BI 蛋白在 HepG2 肝细胞高效表达, 为 SR-BI 生理学作用机制及临床应用的深入研究奠定基础。

关键词: 高密度脂蛋白; B 族 I 型清道夫受体; 腺相关病毒; HepG2 肝细胞

中图分类号: R541 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2009)06-0696-06

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

ZHANG Yu-ling¹, WU Wei^{2*}, ZHOU Shu-xian¹, LEI Juan¹

(1. Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China;

2. Department of Cardiology, The Fifth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, China)

Abstract: 【Objective】The recombinant adeno-associated virus serotype 2/1 (rAAV2/1) hybrid vector containing human scavenger receptor class B type I gene (SR-BI) was constructed and its expression was examined in human HepG2 hepatoma cells. 【Methods】The SR-BI cDNA which was obtained by PCR from pCMV.SPORT6-SR-BI plasmid was inserted into the AAV vector plasmid pSNAV2.0-IRES-EGFP-LacZa. The recombinant plasmid pSNAV2.0-SR-BI-IRES-EGFP was transfected into BHK21 cells by LipofactamineTM2000 after being identified by restriction endonuclease digestion and DNA sequencing. The rAAV vector producing cells were selected with G418. The G418 resistant cells were infected by helper recombinant rHSV/rep2cap1 viruses containing rep gene from AAV2 and cap gene from AAV1. The Cells were cultured and purified to obtain rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP. The expression of recombinant vectors rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP in human HepG2 hepatoma cells was examined by immunofluorescent microscopy and Western blot analysis. 【Results】The recombinant plasmid pSNAV2.0-SR-BI-IRES-EGFP was confirmed by digestion with restriction enzyme and the sequence of subcloned SR-BI cDNA was identical with that published on GenBank. The hybrid vectors rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP was successfully constructed. The best MOI value in HepG2 hepatoma cells was 1×10^5 . The fluorescence was highly expressed after transfected in HepG2 hepatoma cells. Higher levels of SR-BI protein

收稿日期: 2009-05-12

基金项目: 广东省科技计划项目(4009434)

作者简介: 张玉玲, 博士, 副教授, E-mail: zhangyuling@yahoo.com.cn; * 通信作者, 伍卫, 教授, 博士生导师, E-mail: wu.wei@medmail.com.cn

expression were detected in the rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP transfected HepG2 cells than those in the negative control and rAAV2/1-IRES-EGFP transfected HepG2 cells ($P < 0.01$). 【Conclusions】 The rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP hybrid vectors were successfully constructed and high efficiency expressed in human HepG2 hepatoma cells. Thus, the rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP vector may be an interesting tool for specific transgene expression approach to atherosclerosis diseases.

Key words: High density lipoprotein; Scavenger receptor class B type I receptor; Adeno-associated virus; human HepG2 hepatoma cells

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2009, 30(6): 696-701]

冠心病是发达国家和大多数发展中国家首要的死亡原因,动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是冠心病的主要病理基础,高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)水平与冠心病的发病呈负相关^[1], HDL通过参与胆固醇逆转运(reverse cholesterol transport, RCT)而影响了AS的发生^[2], HDL B族I型清道夫受体(scavenger receptor class B type I, SR-BI)在RCT过程中起关键作用,研究表明SR-BI基因表达增加,可以通过增加RCT而减少AS^[3]。腺相关病毒载体(adeno-associated viral vector, AAV vector)是目前最安全的病毒载体,血清型2的重组腺相关病毒载体(rAAV2)携带治疗基因可纠正多种基因缺陷,但正常人群中85%存在AAV2的抗体^[4]。而重组血清型1的腺相关病毒(rAAV1)对肝细胞及骨骼肌则有更高的转导效率,可以转导外源基因在实质脏器持续稳定表达^[5]。rAAV2/1具有AAV2的ITR和AAV1的外壳,感染特性与AAV1一致,可避免抗AAV2抗体产生的干扰^[6]。目前尚未见将rAAV2/1应用于SR-BI基因转导的报道。本实验拟构建重组人B族I型清道夫受体基因rAAV2/1杂合载体,并转染人HepG2肝细胞,观察其在HepG2肝细胞的表达,为SR-BI生理学作用机制及临床应用的深入研究奠定基础,为动脉粥样硬化的防治研究提供新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

含人B族I型清道夫受体基因的真核表达质粒pCMV.SPORT6-SR-BI购自中晶生物(openbiosystem产品),包装质粒pSNAV2.0-IRES-EGFP-LacZa及携带rep2-cap1基因的辅助病毒rHsv/r2cl由北京本元正阳基因公司提供。大肠杆菌DH-5 α 及含100 mL/L胎牛血清的PRMI 1640培养液购自GIBCO/BRL公司, T4DNA连接酶、限制性内切酶

*EcoR*和*Sal*购自Biolab/BRL公司。V-gene质粒提取试剂盒购自QIAGEN公司, LipofactamineTM购自GIBCO/BRL公司, HepG2肝细胞购自ATCC。

1.2 实验方法

1.2.1 含SR-BI基因的重组质粒pSNAV2.0-SR-BI-IRES-EGFP的构建及鉴定 根据GenBank中人SR-BI的基因序列设计引物,上游引物SR-AgeI-1550-F 5'-GCCAACCGGTATGGCGGCAGCTCCAGG-3',下游引物BI-NheI-1550-R 5'-CTGCCGTAGCTATAGCTTGGCTTCTTGCAG-3',上游引入AgeI位点,下游引入NheI酶切位点,以pCMV.SPORT6-SR-BI为模板扩增目的基因,PCR得到SR-BI的cDNA, pCMV.SPORT6-SR-BI质粒经PCR鉴定。

应用AgeI和NheI限制性内切酶双酶切载体质粒pSNAV2.0-IRES-EGFP-LacZa和目的基因SR-BI的PCR产物,回收约8.4 kb的pSNAV2.0-IRES-EGFP载体片段和1.5 kb的SR-BI目的基因片段。T4 DNA连接酶25℃室温连接1 h。连接产物热休克法转化入感受态大肠杆菌DH-5 α ,挑取单克隆菌落37℃摇床振荡培养18 h,以V-gene质粒提取试剂盒提取质粒,所得的重组质粒命名为pSNAV2.0-SR-BI-IRES-EGFP。引入上述PCR反应体系行PCR反应鉴定, AgeI + NheI双酶切鉴定重组pSNAV2.0-SR-BI-IRES-EGFP质粒。对经PCR和酶切鉴定正确的重组pSNAV2.0-SR-BI-IRES-EGFP质粒进一步进行测序鉴定。

1.2.2 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP的制备及纯度与滴度的测定 按LipofactamineTM2000说明书提供的方法,用脂质体将pSNAV2.0-SR-BI-IRES-EGFP质粒转染BHK-21细胞,24 h后用含G418(800 μ g/mL)的培养基筛选培养,待抗性克隆形成后,用2.5 g/L胰酶消化传代,继续用G418选择培养,将该细胞株命名为BHK/SR-BI-IRES-EGFP载体细胞株。

用 25 cm² 含 100 mL/L 胎牛血清的 1640 培养基培养载体细胞株, 细胞达到 80% 融合时用携带 rep2-cap1 基因的辅助病毒 rHsv/r2cl 感染 (MOI 为 0.1) 细胞株, 48 h 完全病变后, 反复冻融细胞, 1 000 r/min ($r = 12$ cm) 离心 5 min, 去除细胞碎片, 收集上清。然后置 56 °C 水浴 30 min, 灭活辅助病毒 rHsv/r2cl, 得到载体 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 病毒。PCR 鉴定重组 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 病毒, SDS 聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 检测纯度, 滴度测定采用地高辛标记点杂交法^[7]。

1.2.3 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 在 HepG2 肝细胞的表达 以每孔 1×10^5 个细胞接种于 24 孔板中, 加入含 100 mL/L 胎牛血清的 1640 培养基, 于 37 °C 体积分数为 5% 的 CO₂ 孵箱中培养。培养至 60% 融合时, 弃去培养上清, 按感染复数分别为 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 加入 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 病毒悬液, 8 h 后吸出病毒液, 加入普通培养基继续培养, 分别于 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 7 d 在荧光显微镜下观察转化效率, 即绿色荧光蛋白阳性细胞数/细胞总数。提取病毒转染后 72 h 的 HepG2 肝细胞按每 20 mg 组织加 150 μ L 裂解液加入匀浆器匀浆, 4 °C 12 000 r/min ($r = 12$ cm) 离心 20 min, 取上清, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白定量。取 35 μ g 蛋白上样, 经 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 转移至 0.22 μ m 的醋酸纤维素膜上, 50 g/L 脱脂奶粉 37 °C 封闭 3 h, 分别加入 1:1 000 的兔抗 SR-BI 单克隆抗体和 1:100 的兔抗 β -actin 抗体, 4 °C 过夜, 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔的二抗进行蛋白杂交检测, ECL 显色试剂盒显色。

1.2.4 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 原始质粒 pCMV.SPORT6-SR-BI 的 PCR 电泳鉴定

pCMV.SPORT6-SR-BI 经 PCR 扩增可以扩增出 1 550 bp 大小 cDNA 的片段, 与 GenBank 中 hSR-BI cDNA 序列一致 (图 1)。

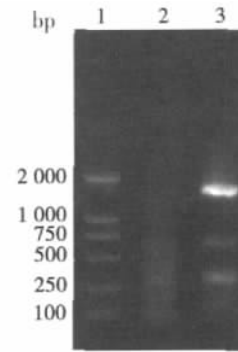


图 1 原始质粒 pCMV.SPORT6-SR-BI PCR 鉴定图
Fig.1 Identification of plasmid pCMV.SPORT6-SR-BI by PCR

Lane 1: 2 000 bp DNA Marker; Lane 2: negative control; Lane 3: pCMV.SPORT6-SR-BI

2.2 重组 pSNAV2.0-SR-BI-IRES-EGFP 质粒的 PCR、酶切及测序鉴定

重组质粒 pSNAV2.0-SR-BI-IRES-EGFP 经 PCR 扩增电泳条带大小约 1 550 bp, 与预期结果相同, 说明这些质粒中含有目的基因 SR-BI (图 2)。AgeI + NheI 双酶切 pSNAV2.0-SR-BI-IRES-EGFP 质粒能获得大小约 8.4 kb 和 1.5 kb 的条带, 从电泳图中看酶切条带大小与预期结果相同, 酶切鉴定正确 (图 3), 表明重组 pSNAV2.0-SR-BI-IRES-EGFP 质粒构建成功。测序结果表明拼接序列与 GenBank 提供全序列一致, 装入 PSNAV 质粒中的 SR-BI 基因是正确的。

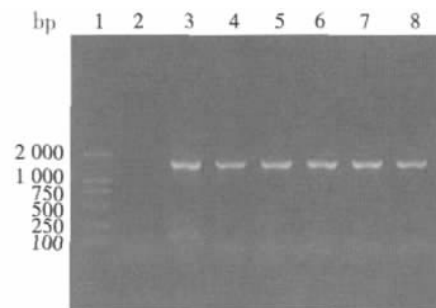


图 2 PCR 鉴定重组质粒 pSNAV2.0-SR-BI-IRES-EGFP
Fig.2 Identification of recombinant plasmid pSNAV2.0-SR-BI-IRES-EGFP by PCR

Lane 1: 2 000 bp DNA Marker; Lane 2: negative control; Lane 3: pCMV.SPORT6-SR-BI; Lane 3-8: pSNAV2.0-SR-BI-IRES-EGFP

2.3 重组 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 载体鉴定及纯度与滴度测定

重组 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 载体病毒

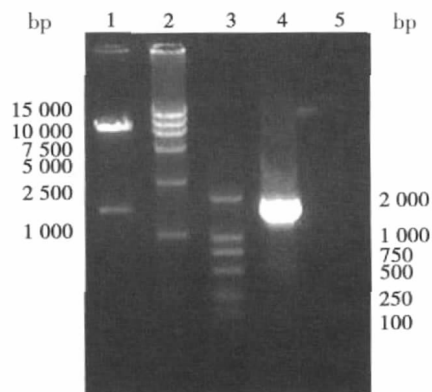


图 3 AgeI + NheI 酶切鉴定重组质粒 pSNAV2.0-SR-BI-IRES-EGFP

Fig.3 AgeI + NheI restriction products of pSNAV2.0-SR-BI-IRES-EGFP

Lane 1: NheI+ AgeI restriction products; Lane 2: 15 000 bp DNA Marker; Lane 3: 2 000 bp DNA Marker; Lane 4: pSNAV2.0-SR-BI-IRES-EGFP; Lane 5: negative control

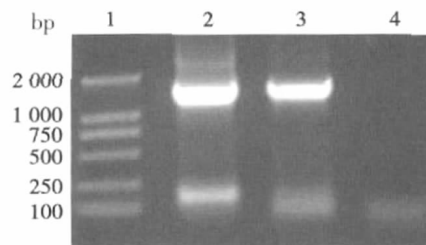


图 4 重组腺相关病毒 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 载体 PCR 鉴定

Fig.4 Identification of rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP vectors by PCR

Lane 1: 2 000 bp DNA Marker; Lane 2: pSNAV2.0-SR-BI-IRES-EGFP; Lane 3: rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP; Lane 4: negative control

PCR结果能够特异地扩增出 1 550 bp 大小的目的基因条带,证明该重组腺病毒携带目的基因 SR-BI (图 4)。用 SDS-PAGE 电泳分析 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 的纯度,表现为 3 条特征性的蛋白条带,无其他杂带,表明病毒载体的纯度在 95% 以上。用地高辛标记的点杂交方法计算出 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 的大致滴度为 1.5×10^{12} $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.4 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 在 HepG2 肝细胞的表达

以纯化的 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 感染 HepG2 肝细胞,当感染复数为 1×10^5 时,72 h 感染效率可达 86%;当感染复数为 5×10^5 时,感染效率与 1×10^5 差异无显著性 ($P > 0.05$),因此重

组 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 对 HepG2 肝细胞的最佳感染复数为 1×10^5 (表 1)。以此 MOI 值转染 HepG2 肝细胞 24 h 免疫荧光显微镜观察即可见到绿色荧光蛋白表达,72 h 绿色荧光蛋白表达最强(图 5)。

表 1 不同 MOI 值 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 转染 HepG2 肝细胞的转染效率

Table 1 Efficiency of recombinant rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP infecting HepG2 liver cell (%)

	Multiplicity of infection			
	1×10^4	5×10^4	1×10^5	5×10^5
24 h	3	12	21	26
48 h	9	25	60	60
72 h	21	60	85	86
96 h	22	63	85	85
7 d	22	65	87	88



图 5 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 转染 HepG2 肝细胞后绿色荧光蛋白表达

Fig.5 Fluorescent protein expression of HepG2 liver cell after transfection by rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP

A: 24 h after transfection; B: 48 h after transfection; C: 72 h after transfection; $\times 20$

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,差异有显著性($P < 0.01$,图 6)。

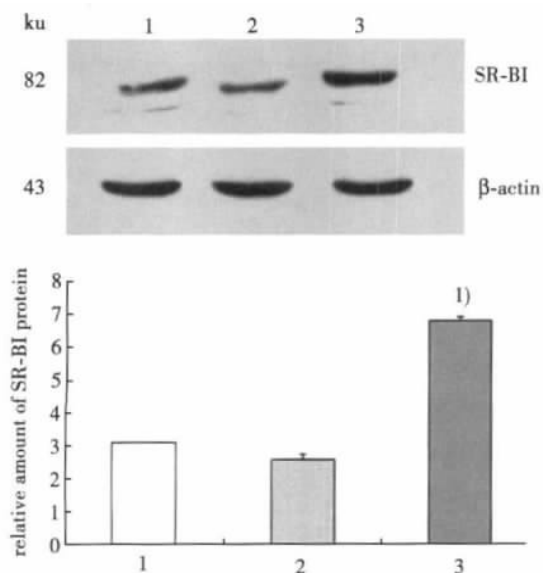


图 6 rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP 转染 HepG2 肝细胞 72 h 后 SR-BI 蛋白的表达

Fig.6 The expression of SR-BI protein in HepG2 liver cell after transfection of rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP for 72 h

1. negative control; 2. transfection of rAAV2/1-IRES-EGFP; 3. transfection of rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP

1) Compared with 1 and 2, $P < 0.01$; (Western blot)

3 讨论

研究报道 HDL 低于 35 mg/dl 在男性中的发生率约为 16% ~ 18%,女性约为 3% ~ 6%,大量的流行病学资料^[8-9]研究证明低 HDL 水平是冠心病的独立危险因素,如 Framingham^[9]研究中 43% ~ 44% 的冠心病事件与 HDL-C 低于 40 mg/dL 相关, HDL-C 低于 35 mg/dL 的个体冠心病事件的风险较 HDL-C 高于 65 mg/dL 增高 8 倍。但是 HDL 抗动脉粥样硬化的机制尚不清楚。

SR-BI 最早是在从乙酰化 LDL 为配体克隆的清道夫受体家族中发现的,属清道夫受体家族 B 亚族 I 型,而人类 SR-BI(hSR-BI)是作为 CD36 膜蛋白超家族及溶酶体整合膜蛋白相关蛋白被独立发现的,又称 CLA-I,1996 年 Acton 等^[10]发现 SR-

BI 可与 HDL 高亲和性结合,介导 HDL-C 的选择性摄取,首次提出 SR-BI 是 HDL 的受体,SR-BI 在体内各种组织如肝脏、肾上腺、卵巢及睾丸等广泛表达。

研究表明 SR-BI 通过影响 RCT 而具有抗动脉粥样硬化的功能^[11],RCT 指外周组织中游离胆固醇的流向 HDL, HDL 脂蛋白经 SR-BI 介导转运至肝脏合成胆汁酸。如在 LDL 受体缺陷小鼠的肝细胞中过量表达 SR-BI, 喂饲高胆固醇食物后 AS 损伤明显低于未过量表达 SR-BI 的 LDL 受体缺陷小鼠^[12];而在载脂蛋白 E 基因(Apo E)敲除小鼠中再敲除 SR-BI 基因将加速 AS 的发展^[13]。但是 SR-BI 抗 AS 机制及其在肝脏中的调节过程尚不清楚,应用基因工程技术将 SR-BI 基因重组入宿主细胞基因组中,使 SR-BI 获得持续的表达进一步研究其抗动脉粥样硬化的机制是这一领域中重要研究方向。

重组腺相关病毒载体(rAAV)源于非致病的野生型腺相关病毒,由于其安全性好、宿主细胞范围广(分裂和非分裂细胞)、免疫源性低,在体内表达外源基因时间长等特点,被视为最有前途的基因转移载体之一,广泛用于基因功能研究、基因治疗等方面^[14]。目前已发现的 AAV 至少有 8 种血清型,即 AAV1 ~ AAV8,它们主要区别在衣壳蛋白的不同,各种血清型 AAV 对不同的组织和细胞有不同的感染效率。目前通用的 AAV 载体都基于血清型 2,但正常人群中 85% 存在 AAV2 的抗体,而采用其它血清型的 AAV 病毒外壳,可以减少已有的抗体对 AAV 载体的影响^[6]。AAV1 载体在肌肉组织和肝脏中的转导效率较高。用 AAV2 的 ITR,换上血清型 AAV1 的 cap 蛋白,就可以得到感染特性与 AAV1 一致 rAAV2/1 杂合载体^[15]。

本研究首次构建了 BHK/SR-BI-IRES-EGFP 载体细胞株,用携带 AAV 的 rep2-cap1 基因的辅助病毒 rHsv/r2c1 感染已经整合了 ITR-SR-BI-ITR 的 AAV 包装细胞株,得到了携带 SR-BI 基因的 rAAV2/1 杂合载体。其中,rep2-cap1 指来源于 AAV2 的 rep 和来源于 AAV1 的 cap 基因,由于含有来自 AAV2 的 rep 基因,该辅助病毒(rHsv/r2c1)可以识别并包装来自 AAV2 的 ITR,得到的 rAAV2/1 杂合载体 ITR 来自 AAV2,而外壳来自 AAV1,采用这种方式制备的 rAAV2/1 杂合载体具有野生型 AAV1 的感染特性^[15]。在人体临床基

因治疗时可能避免已存在的抗AAV2抗体产生的干扰。

本研究将重组腺相关病毒rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP杂合载体系统成功转染人HepG2肝细胞,转染后绿色荧光蛋白表达可以高效稳定表达,同时SR-BI蛋白表达显著增高,表明重组腺相关病毒rAAV2/1-SR-BI-IRES-EGFP杂合载体能够高效的介导肝细胞的转染,为SR-BI在肝细胞中生物学作用机制及临床应用的深入研究奠定基础。

参考文献:

- [1] Hausenloy DJ, Yellon DM. Targeting residual cardiovascular risk: raising high-density lipoprotein cholesterol levels [J]. *Heart*, 2008, 94(6):706-714.
- [2] Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport [J]. *Circ Res*, 2005, 96(12):1221-1232.
- [3] Rhoads D, Brodeur M, Lapointe J, et al. The role of human and mouse hepatic scavenger receptor class B type I (SR-BI) in the selective uptake of low-density lipoprotein-cholesteryl esters [J]. *Biochemistry*, 2003, 42(24): 7527-7538.
- [4] Yamano S, Huang LY, Ding C, et al. Recombinant adeno-associated virus serotype 2 vectors mediate stable interleukin 10 secretion from salivary glands into the bloodstream [J]. *Hum Gene Ther*, 2002, 13(2): 287-298.
- [5] Wang C, Wang CM, Clark KR, et al. Recombinant AAV serotype 1 transduction efficiency and tropism in the murine brain[J]. *Gene Ther*, 2003, 10(17):1528-1534.
- [6] Hauck B, Xu RR, Xie J, et al. Efficient AAV1-AAV2 hybrid vector for gene therapy of hemophilia [J]. *Hum Gene Ther*, 2006, 17(1): 46-54.
- [7] 吴小兵,董小岩,伍志坚,等. 一种快速高效分离和纯化重组腺病毒伴病毒载体的方法 [J]. *科学通报*, 2000,4(19)2071-2075.
- [8] Sharrett AR, Ballantyne CM, Coady SA, et al. Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein (a), apolipoproteins A-I and B, and HDL density subfractions: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study [J]. *Circulation*, 2001, 104(10): 1108-1113.
- [9] 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.
- [10] Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, et al. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor [J]. *Science*, 1996, 271(5248): 518-520.
- [11] Zhang Y, Ahmed AM, Tran TL, et al. The inhibition of endocytosis affects HDL-lipid uptake mediated by the human scavenger receptor class B type I [J]. *Mol Membr Biol*, 2007, 24(5-6): 442-454.
- [12] Arai T, Wang N, Bezouevski M, et al. Decreased atherosclerosis in heterozygous low density lipoprotein receptor deficient mice expressing the scavenger receptor BI transgene [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(4): 2366-2371.
- [13] Braun A, Trigatti BL, Post MJ, et al. Loss of SR-BI expression leads to the early onset of occlusive atherosclerotic coronary artery disease, spontaneous myocardial infarctions, severe cardiac dysfunction, and premature death in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Circ Res*, 2002, 90(3): 270-276.
- [14] Kilian EG, Eifert S, Beiras-Fernandez A, et al. Adeno-associated virus-mediated gene transfer in a rabbit vein graft model[J]. *Circ J*, 2008, 72(10):1700-1704.
- [15] Sandalon Z, Bruckheimer EM, Lustig KH, et al. Long-term suppression of experimental arthritis following intramuscular administration of a pseudotyped AAV2/1-TNFR:Fc Vector [J]. *Mol Ther*, 2007, 15(2): 264-269.

(编辑 孙慧兰)