

SR-BI 过表达对 J774 细胞胆固醇转运的影响

曾 颖^{1,2},冯惊涛²,孙玉慧³,孙 琳²,曾德星²,易光辉²

(1. 南华大学 护理学院,湖南 衡阳 421001;2. 南华大学 心血管病研究所
3. 广东省江门出入境检验检疫局 国际旅行卫生保健中心)

摘 要: **目的** 用构建的人 SR-BI(hSR-BI)真核表达载体转染 J774 细胞,观察细胞瞬时过表达 SR-BI 对 J774 细胞胆固醇转运功能的影响。**方法** 用 hSR-BI cDNA 转染法转染 J774 细胞,用 RT-PCR 和 Western blot 检测各组细胞的 SR-BI 表达,优化转染条件;用液体闪烁计数法检测流入和流出细胞的 [³H]胆固醇量,分析过表达 SR-BI J774 细胞的胆固醇转运功能。**结果** 与对照组和空载体转染的 J774 细胞相比,pcDNA3.1(-)+hSR-BI 转染的 J774 细胞 SR-BI 表达升高;与空载体转染的 J774 细胞相比,pcDNA3.1(-)+hSR-BI 转染的 J774 细胞的胆固醇双向转运功能增强。**结论** 用 hSR-BI 真核表达载体 pcDNA3.1(-)+hSR-BI 成功转染了 J774 细胞,使细胞过表达 SR-BI,过表达的 hSR-BI 具有促进胆固醇转运的作用。

关键词: SR-BI; 单核/巨噬细胞; 转染; 过表达; 胆固醇转运
中图分类号:R541.4 **文献标识码:**A **文章编号:**2095-1116(2011)01-0010-04

Effect of Overexpression of SR-BI on Cholesterol Trafficking in J774 Cells

ZENG Ying,FENG Jing-tao,SUN Yu-hui,et al
(School of Nursing,University of South China,Hengyang,Hunan 421001,China)

Abstract: Objective To investigate the effect of overexpression of SR-BI on the cholesterol trafficking in J774 cells.
Methods J774 cells were transiently transfected by cloned hSR-BI to express hSR-BI,an 82 kDa protein. The expression of SR-BI were detected by RT-PCR and Western blot. The influx and efflux of [³H] cholesterol from cells were determined by liquid scintillation counting. **Results** The human scavenger receptor class B type I (hSR-BI) cDNA was successfully transfected into J774 cells. The expression level of SR-BI was elevated in J774 cells transfected with pcDNA3.1(-)+hSR-BI compared to control and vector (*P*<0.05). The function of cholesterol trafficking in J774 cells transfected with pcDNA3.1(-)+hSR-BI was reinforced compared to control and vector. **Conclusion** Overexpression of SR-BI can promote cholesterol trafficking in J774 cells.

Key words:SR-BI; monocyte/macrophage; transfection; overexpression; cholesterol trafficking

动脉粥样硬化性疾病是危害人类健康的第一大杀手,其发生发展与血浆脂质和血管炎症密切相关。B 类 I 型清道夫受体 (scavenger receptor-BI, SR-BI) 是位于细胞膜表面的高密度脂蛋白 (HDL) 受体,是体内发挥抗动脉粥样硬化作用的主要受体之一。SR-BI 可有效地抑制动脉粥样斑块的形成和延缓动脉粥样硬化的进展。SR-BI 是参与逆向胆固醇转运 (reverse cholesterol transshipment, RCT) 与调节脂质代谢的重要受体^[1],在动脉壁的单核/巨噬细胞和肝脏和类固醇激素生成组织等都丰富地表达。SR-BI 通过改变细胞膜胆固醇的分布,介导细胞的游离胆固醇 (FC) 流出到 HDL,发挥抗动脉粥样硬化的作用;此外,SR-BI 通过介导对 HDL-CE 的选择性摄取,从而降低血浆胆固醇水平、刺激 RCT,发挥抗动

收稿日期:2010-12-17
基金项目:湖南省教育厅重点基金资助项目(09A078).
通讯作者:易光辉,教授,博士,硕导,E-mail:ghyi6108@163.com.

脉粥样硬化的作用。本文旨在通过用构建的人 SR-BI(hSR-BI)真核表达载体转染 J774 细胞,使细胞瞬时过表达 SR-BI,观察其对 J774 细胞胆固醇转运功能的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

含 hSR-BI cDNA 的腺病毒穿梭质粒 pAv + hSR-BI 由奥地利 Graz 大学 Gert M. Kostner 教授馈赠;真核表达载体 pcDNA3.1(-) 购自美国 Invitrogen 公司;MiniBEST Plasmid Purification Kit, DNA Ligation Kit Ver. 2.0,以及核酸限制性内切酶 EcoRI、KpnI 和 XbaI 均购自宝生物工程(大连)有限公司(Takara);琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒,Long Taq DNA Polymerase,2 × Taq PCR MasterMix, DNA Ladder 均购自天根生化科技有限公司。AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒购自 Promega 公司;所有引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成;羊抗人 SR-BI 抗体购自 Santa Cruz 公司;鼠抗 β -actin 一抗、辣根过氧化物酶标记兔抗羊 IgG 二抗和羊抗鼠 IgG 二抗以及 Western blot 荧光检测试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司;预染蛋白 Marker 购自 Fermentas 公司; ^3H 标记胆固醇购自美国 Sigma 公司。

1.2 细胞培养、转染和实验分组

J774 细胞生长于含有 10% 胎牛血清的 DMEM (高糖)培养液中,37℃、5% CO_2 培养箱中静置培养。

1.2.1 基本的转染 在转染的前一天,对细胞进行传代和换液,将同一批生长良好的 J774 细胞分为 3 组,其中一组不处理(空白对照组),另两组分别用空载体 pcDNA3.1(-)(空载体对照组)和构建的载体 pcDNA3.1(-) + hSR-BI(SR-BI 表达载体组)转染 J774 细胞(转染方法见 TfxTM-20 Reagent 转染试剂盒说明书,转染试剂和 DNA 比率采用 3:1, DNA 的使用剂量采用说明书推荐的 5 μg /60mm 直径培养皿),然后于 37℃、5% CO_2 培养箱中培养 48 h,用 RT-PCR 和 Western blot 分析其 SR-BI 表达情况。

1.2.2 SR-BI 的过表达对 J774 细胞的胆固醇转运的影响 将空载体 pcDNA3.1(-)和表达载体 pcDNA3.1(-) + hSR-BI 转染的 J774 细胞分别又分为 3 组,转染后 1 h 把各组细胞用 0.2 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ [^3H]胆固醇孵育细胞 24 h,其中一组不处理(空载体未处理组、SR-BI 表达载体未处理组),另两组分别用 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的 DMSO(空载体 + DMSO 组、SR-BI 表达载

体 + DMSO 组)和 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 BLT-4 2 μL (空载体 + BLT-4 组、SR-BI 表达载体 + BLT-4 组)分别孵育 24 h,用闪烁计数法检测其胆固醇流入、流出情况。

1.3 液体闪烁计数法检测细胞内胆固醇的流入和流出

胆固醇流入和流出检测参照文献[2]的方法进行。

1.4 RT-PCR 检测细胞内 SR-BI 的 mRNA 水平

用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA。取总 RNA 2 μg ,用 Promega 公司逆转录试剂盒合成 cDNA,再取逆转录产物 1.0 μL 进行 PCR 循环。hSR-BI(GenBank 序列号:NM_005505)和鼠 SR-BI(GenBank 序列号:U37799)共用引物序,内参照采用鼠 β -actin(GenBank 序列号:NM_007393),进行 PCR 反应。反应结束后,取 RT-PCR 产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶中电泳,溴化乙锭染色。电泳条带采用 UVP 型凝胶图像分析系统测定和分析。

1.5 Western blot 检测 SR-BI 蛋白的表达

收集细胞,经 PBS 洗涤 3 次,加入悬浮裂解液中裂解细胞后,于 4℃,10 000 × g 离心 10 min,小心吸出上清液,用 BCA 法进行蛋白质定量。蛋白质点样量为 50 μg ,60 V 积层胶,120 V 分离胶,电泳分离细胞蛋白质,100mA 2h 将蛋白质转移至 PDVF 膜上。5%脱脂牛奶室温封闭 2 h 后,加入一抗,4℃孵育 1 h;TBST 洗膜 15 min;加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h;TBST 洗膜 15 min。然后用 Western blot 荧光检测试剂激发荧光,用 X 胶光片压片曝光,显影、定影后进行图像分析。结果以对照组作为内参照,用各处理组的面积灰度值与对照组相比,所得的相对值作统计分析。

1.6 统计学处理

实验所得数据采用均数 $\pm$ 标准差表示,采用方差分析及 t 检验,用 SPSS11.0 统计软件进行分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 hSR-BI 在 J774 细胞表达的鉴定

设计人鼠共用 SR-BI 引物序列和购买人鼠 SR-BI 共抗多克隆抗体,然后分别用 RT-PCR 和 Western blot 检测细胞的 SR-BI 表达情况。结果显示(图 1),与对照组和空载体转染的 J774 细胞相比,hSR-BI 真核表达载体转染 J774 细胞的 SR-BI mRNA 和蛋白表达水平均明显较对照组和空载体转染 J774

细胞升高,差异有显著性($P < 0.05$),hSR-BI 真核表达载体可以在 J774 细胞表达。

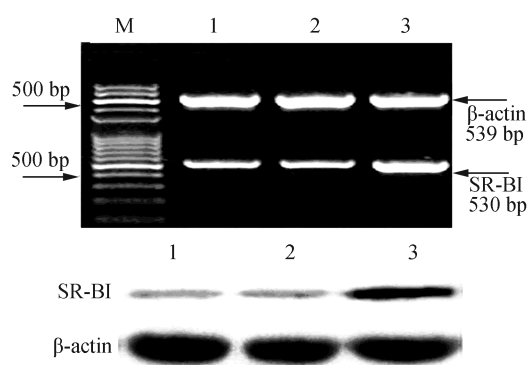


图1 各组 J774 细胞的 SR-BI mRNA 和蛋白表达情况
M: Marker; 1: 空白对照组; 2: 空载体对照组; 3: SR-BI 表达载体组

2.2 过表达 SR-BI 促进 J774 细胞 FC 的双向转运

液体闪烁计数法检测 J774 细胞 $[^3\text{H}]$ 胆固醇的流入和流出情况,结果显示(图2),SR-BI 真核表达

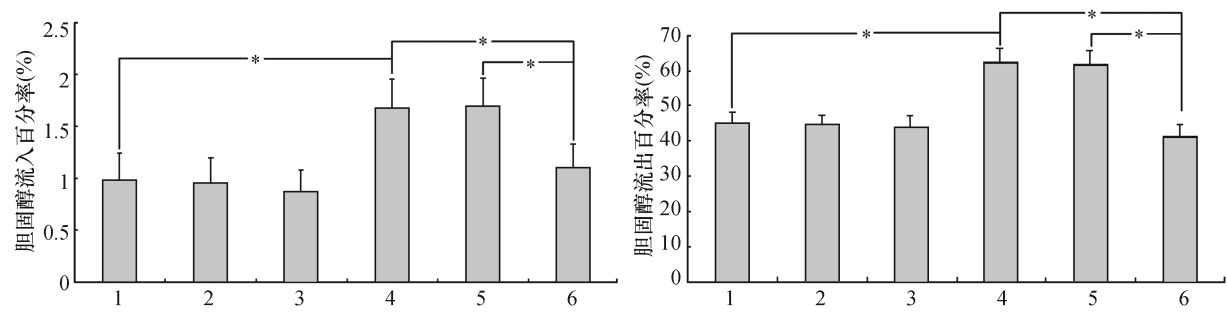


图2 液体闪烁计数法检测 J774 细胞的 $[^3\text{H}]$ 胆固醇流入和流出情况
1:空载体未处理组;2:空载体 + DMSO 组;3:空载体 + BLT - 4 组;4:SR-BI 表达载体未处理组;5:SR-BI 表达载体 + DMSO 组;6:SR-BI 表达载体 + BLT - 4 组; *: $P < 0.05$

单核/巨噬细胞表达 SR-BI 的抗动脉粥样硬化作用机制尚未明确,根据目前的实验报道大概有以下三种机制:(1) SR-BI 在单核/巨噬细胞上的表达可以改变胆固醇在细胞上的分布介导 FC 的双向流动;可以调节细胞 FC 的酯化和 CE 的水解。因而单核/巨噬细胞 SR-BI 可以增强细胞处理胆固醇的能力,利于细胞内胆固醇代谢的动态平衡,使 RCT 易于实现^[10]。(2) 单核/巨噬细胞 SR-BI 的表达可以增强小窝蛋白 1 的稳定性。小窝蛋白 1 是膜囊泡所特有的一种蛋白,因为膜囊泡调节了细胞内胆固醇代谢的动态平衡,参与了细胞跨膜信号转导,所以单核/巨噬细胞 SR-BI 的表达可能会影响一定的信号

载体转染的 J774 细胞 $[^3\text{H}]$ 胆固醇流入和流出均增多($P < 0.05$),且都可以被 SR-BI 的抑制剂 BLT - 4 抑制($P < 0.05$)。hSR-BI 在 J774 细胞上的过表达既可以促进细胞外胆固醇的流入($P < 0.05$),也可以促进细胞内胆固醇的流出($P < 0.05$),即 SR-BI 的过表达可以促进细胞 FC 的双向转运,与文献[3]报道一致。

3 讨 论

SR-BI 是第一个在分子水平上证实的位于细胞膜表面的 HDL 受体,是参与逆向胆固醇转运(RCT)、调节脂质代谢的重要受体,具有重要的抗动脉粥样硬化作用^[4,5]。SR-BI 的抗动脉粥样硬化作用与肝脏 SR-BI 的表达密切相关^[6],单核/巨噬细胞 SR-BI 也具有重要的作用。近来研究报道,SR-BI 的抗动脉粥样硬化作用不但与肝脏 SR-BI 的表达有关,而且与肝外组织所表达的 SR-BI 关系密切^[7~9]。

转导途径^[11]。(3) 动脉壁细胞 SR-BI 的表达缺陷可以异常诱导血管炎症的产生,因此单核/巨噬细胞 SR-BI 的表达可能可以抑制斑块局部的炎症反应。hSR-BI 的抗动脉粥样硬化作用是对 SR-BI 研究的最终目标。

J774 细胞是一种 apoE 缺陷且低表达 SR-BI 的小鼠巨噬细胞系细胞^[12]。本文选用这种细胞为转染细胞的目的是为本课题组今后的小鼠体内实验做准备,便于检测 SR-BI 过表达效应。另外,单核/巨噬细胞是动脉粥样斑块中含量最多、且高表达 SR-BI 的细胞。本文用构建好的载体 pcDNA3.1 (-) + hSR-BI 转染 J774 细胞,用 RT - PCR 和 Western blot

确定了 hSR-BI 可以在 J774 细胞内转录和翻译。

SR-BI 在肝等细胞表达可以介导 HDL - CE 的选择性摄取,调节血浆胆固醇含量;而在其他细胞的表达,则可以介导 FC 进入细胞和酯化,同时可以介导细胞内胆固醇流出,也就是说 SR-BI 可以介导 FC 在 HDL 和细胞之间的双向流动^[13]。本研究通过液体闪烁计数法观察了 J774 细胞表达的 hSR-BI 对 [³H]胆固醇流入和流出细胞的影响,结果显示克隆的 hSR-BI 可以促进 FC 在细胞和 HDL 之间的双向转运,且这一作用可以被 SR-BI 的抑制剂 BLT - 4 所抑制,表明克隆的 hSR-BI 在 J774 细胞的表达具有正常的 FC 转运功能。

本研究还发现,BLT - 4 可以抑制 SR-BI 真核表达载体转染的 J774 细胞贴壁,造成细胞大量死亡,而其他组细胞则不出现这种情况。细胞贴壁与细胞外基质有关,BLT - 4 抑制细胞贴壁的原因可能是通过抑制 HDL 与 SR-BI 的结合、从而导致细胞释放基质金属蛋白酶增多所致。基质金属蛋白酶与不稳定性动脉粥样斑块密切相关,SR-BI/apoE 双基因敲除鼠早期就会出现心肌梗死可能与此有关,这一点有待进一步研究。

参考文献:

[1] Van Eck M, Pennings M, Hoekstra M, et al. Scavenger receptor BI and ATP-binding cassette transporter A1 in reverse cholesterol transport and atherosclerosis[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2005, 16(3):307-315.

[2] Zhang Y, Da Silva JR, Reilly M, et al. Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport in vivo[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(10):2870-2874.

[3] 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.

[4] 杨永宗,阮长耿,唐朝枢,等. 动脉粥样硬化性心血管病基础与临床[M]. 北京:科学出版社,2004. 77-78.

[5] Thanopoulou K, Fragkouli A, Stylianopoulou F, et al. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) regulates perivascular macrophages and modifies amyloid pathology in an Alzheimer mouse model[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(48):20816-20821.

[6] Ahmed RA, Murao K, Imachi H, et al. Human scavenger receptor class B type 1 is regulated by activators of peroxisome proliferators-activated receptor-gamma in hepatocytes[J]. *Endocrine*, 2009, 35(2):233-242.

[7] Brundert M, Heeren J, Bahar-Bayansar M, et al. Selective uptake of HDL cholesteryl esters and cholesterol efflux from mouse peritoneal macrophages independent of SR-BI[J]. *J Lipid Res*, 2006, 47(11):2408-2421.

[8] Huby T, Doucet C, Dacet C, et al. Knockdown expression and hepatic deficiency reveal an atheroprotective role for SR-BI in liver and peripheral tissues[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(10):2767-2776.

[9] Zhao Y, Pennings M, Hildebrand RB, et al. Enhanced Foam Cell Formation, Atherosclerotic Lesion Development, and Inflammation by Combined Deletion of ABCA1 and SR-BI in Bone Marrow-Derived Cells in LDL Receptor Knockout Mice on Western-Type Diet[J]. *Circ Res*, 2010, 107(12):1397.

[10] Zhang W, Yancey PG, Su YR, et al. Inactivation of macrophage scavenger receptor class B type I promotes atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Circulation*, 2003, 108(18):2258-2263.

[11] Brundert M, Ewert A, Heeren J, et al. Scavenger receptor class B type I mediates the selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl ester by the liver in mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(1):143-148.

[12] Frank PG, Marcel YL, Connelly MA, et al. Stabilization of caveolin - 1 by cellular cholesterol and scavenger receptor class B type I[J]. *Biochemistry*, 2002, 41:11931-11940.

[13] Svensson PA, Englund MC, Snackstrand MS, et al. Regulation and splicing of scavenger receptor class B type I in human macrophages and atherosclerotic plaques[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2005, 5:25.

(此文编辑 蒋湘莲)