

高胆固醇血症患者血小板 B 族 iv 型清道夫受体表达的变化

苟瑜琳¹, 李永红¹, 马贺远²

(1. 青岛大学医学院附属医院心内科, 山东省青岛市 266003; 2. 山东省寿光市田柳医院, 山东省寿光市 262700)

[关键词] 高胆固醇血症; B 族 iv 型清道夫受体; 血管紧张素 Ⅱ

[摘要] 目的 通过观察高胆固醇血症患者 B 族 iv 型清道夫受体表达的变化, 探讨 B 族 iv 型清道夫受体在动脉粥样硬化发生中的作用及其表达变化的机制。方法 随机选取健康对照 60 例和高胆固醇血症患者 80 例, 肘静脉取血, 分离血清、血浆并提取血小板, 放射免疫法检测血浆血管紧张素 Ⅱ水平, 硝酸还原酶法检测血清一氧化氮含量, 实时定量聚合酶链反应和免疫印迹法分别检测血小板 B 族 iv 型清道夫受体的 mRNA 和蛋白表达水平。结果 高脂组的血浆血管紧张素 Ⅱ水平和血清一氧化氮水平均较对照组明显升高 ($P < 0.01$)。高脂组血小板 B 族 iv 型清道夫受体的 mRNA 和蛋白表达均较对照组明显降低 ($P < 0.05$ 和 0.01)。高脂组的血管紧张素 Ⅱ水平与 B 族 iv 型清道夫受体的表达呈显著负相关 ($r = -0.488$, $P < 0.05$)。结论 高胆固醇血症患者血小板 B 族 iv 型清道夫受体表达的降低与血管紧张素 Ⅱ的刺激有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Expression of Scavenger Receptor Class B Type iv in Patients with Hypercholesterolemia

QING Yu-Lin, LI Yong-Hong and MA He-Yuan

(Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, China)

[KEY WORDS] Hypercholesterolemia; Scavenger Receptor Class B Type iv; Angiotensin Ⅱ

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of scavenger receptor class B type iv (SR-Biv) in atherosclerosis by observing the change of SR-Biv expression. **Methods** Eighty patients with hypercholesterolemia and sixty healthy persons were investigated as hyperlipidemia group and control group respectively. Blood samples were extracted from ulnar vein. Blood serum, plasma and platelets were extracted and stored at a refrigerator of -80°C . The level of angiotensin Ⅱ (Ang Ⅱ) in plasma and nitric oxide (NO) in serum were detected by the method of radioimmunity and nitrate reductase respectively. The expression of SR-Biv mRNA and protein on platelet were assessed by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western Blotting respectively. **Results** The plasma Ang Ⅱ and serum NO of hyperlipidemia group were higher than that of control group ($P < 0.01$). The expression of SR-Biv mRNA and protein on platelets were lower in hyperlipidemia group than those of control group ($P < 0.05$ and 0.01). The expression of SR-Biv protein was inversely correlated with the plasma Ang Ⅱ ($r = -0.488$, $P < 0.05$) in patients with hypercholesterolemia. **Conclusion** The expression of SR-Biv decreases and the decrease of SR-Biv is related to Ang Ⅱ.

血清胆固醇浓度是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 性心、脑血管疾病的重要危险因素, As 的发病机制尚未完全阐明。内皮细胞损伤及其功能减退是 As 发生发展最主要的始动因素。流行病学和临床研究表明, 血浆中低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 水平与 As 的发病率呈正相关, 而高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 水平则与 As 的发病率

呈负相关。B 族 iv 型清道夫受体 (scavenger receptor class B type iv, SR-Biv) 是第一个分子和功能定义明确的高密度脂蛋白 (HDL) 受体^[1], 参与了胆固醇的逆转运过程。目前关于高胆固醇血症时 SR-Biv 表达的变化及其机制研究较少, 本研究对此进行了探讨。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取 2005 年 6 月至 2006 年 6 月在本院健康体检中心体查的男性高胆固醇血症患者 80 例 (高脂组), 平均年龄 56.5 ± 12.7 岁。入选标准为总胆固醇 (total cholesterol, TC) $> 6.24 \text{ mmol/L}$, 同时临床上排除继发性高胆固醇血症 (包括甲状腺、肝胆和肾

[收稿日期] 2008-12-08 [修回日期] 2009-09-02

[基金项目] 青岛市科学技术局资助项目 (02-2-kjyn-25)

[作者简介] 苟瑜琳, 研究方向为动脉粥样硬化的基础与临床, E-mail 为 qingyulin2001@sina.com。通讯作者李永红, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的基础与临床, E-mail 为 liyonghong-66@163.com。

疾患及糖尿病等), 而且入选前 3 个月内无急性心肌梗死、高血压、心绞痛和脑血管意外, 至少 1 个月内未用过调脂药、抗血小板药、钙拮抗剂、硝酸酯类及影响肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 的药物。正常对照组 60 例 (对照组) 均为男性健康体检者, 平均年龄 58.7 ± 15.6 岁, 未用过调脂药、抗血小板药、钙拮抗剂、硝酸酯类及影响 RAS 的药物, 2 周内未服用任何药物。所有研究对象均对实验过程知晓同意, 并分别自肘静脉取血进行检测。

1.2 血脂水平测定

采用全自动生物化学仪检测血清 TC、甘油三酯 (triglyceride, TG)、LDLC 和 HDLC 水平。

1.3 血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 和一氧化氮含量检测

血浆血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ (angiotensin $\text{Ang}(\text{I})$) 水平采用放射免疫分析法检测, 试剂盒购自解放军总医院科技开发中心放免所。血清一氧化氮 (nitric oxide, NO) 含量的测定采用硝酸还原酶法检测, 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.4 血小板的提取

EDTA 抗凝血离心 10 min, 取上层富含血小板血浆 4℃, 2000 g 离心 10 min, 生理盐水洗 2 次, 沉淀即血小板。

1.5 实时定量聚合酶链反应检测 B 族 iv 型清道夫受体 mRNA 表达

将血小板沉淀加入 Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司) 1 mL, 再经氯仿、异丙醇提取总 RNA。紫外分光光度计测定 RNA 的 A_{260}/A_{280} , 确定其纯度。所有实验样品的 A_{260}/A_{280} 均大于 1.8。逆转录反应根据逆转录试剂盒 (美国 Promega 公司) 要求的标准进行。反应条件为 42℃ 1 h, 95℃ 5 min。使用 Light Cycler 扩增仪 (瑞士罗氏公司) 进行实时定量聚合酶链反应。SR-Biv 及内参照 GAPDH 的引物由 Primer 5 软件自行设计。SR-Biv 的引物序列上游为 5'-TTC TCT CCC ATC CTC ACT-3', 下游为 5'-ACC ACA GGC TCA ATC TTC-3', 扩增片长 208 bp。GAPDH 的引物序列上游为 5'-GAC ACC CAC TCC TCC ACC TT-3', 下游为 5'-CCA CCA CCC TGT TGC TGT AG-3', 扩增片长 112 bp。实时定量 PCR 扩增使用 4 步法, SR-Biv 的退火温度为 54℃, GAPDH 的退火温度为 55℃。将 PCR 产物进行 10 倍梯度稀释, 得到不同浓度的标准模板 ($10^{-4} \sim 10^{-12}$), 进行 PCR, 计算机软件制作标准曲线。通过标准曲线, 得出目的基因 SR-Biv 与内参照 GAPDH 扩增产物的浓度比, 用以表示目的基因的相对表达量。

1.6 免疫印迹法检测 B 族 iv 型清道夫受体蛋白的表达

蛋白提取液提取的血小板膜蛋白, 煮沸 5 min 后上样; SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及电转膜后, 分别加入稀释的 SR-Biv 抗体 (1: 200) 和 Actin 抗体 (1: 500) 进行一抗反应, 然后再行二抗反应 (1: 1250) 及 DAB 显色。数字凝胶成像分析系统对 Western Blotting 的电泳条带进行分析。将目的蛋白与内参照 Actin 电泳条带的平均光密度比作为其蛋白含量的相对值。

1.7 统计学分析

计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析。变量间的相关关系采用 Microsoft Excel 进行直线相关分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血脂水平

高脂组 TC、TG 和 LDLC 水平比对照组均明显升高 (P < 0.01), HDLC 水平明显降低 (P < 0.01; 表 1)。

表 1 血脂水平 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

分 组	n	TC	TG	LDLC	HDLC
对照组	60	3.78 \pm 1.05	0.85 \pm 0.27	1.68 \pm 0.41	2.82 \pm 0.53
高脂组	80	7.28 \pm 1.52 ^b	1.61 \pm 0.35 ^b	3.99 \pm 0.65 ^b	1.67 \pm 0.33 ^a

a 为 P < 0.05, b 为 P < 0.01, 与对照组比较。

2.2 血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 和一氧化氮水平

与对照组相比, 高脂组血浆 $\text{Ang}(\text{I})$ 水平和血清 NO 含量明显升高 (P < 0.01; 表 2)。

2.3 B 族 iv 型清道夫受体 mRNA 和蛋白表达水平

SR-Biv 和内参照 GAPDH mRNA 表达水平的浓度比 (CR 值) 高脂组较对照组明显降低 (P < 0.05; 表 2, 图 1 和图 2)。SR-Biv 蛋白分子质量为 57 kDa, 由于其胞外域有多个 N 糖基化位点, 因此 SDS-PAGE 时表现分子质量为 83 kDa。对照组血小板 SR-Biv 蛋白表达较高, 高脂组的表达较对照组明显降低 (P < 0.01; 表 2 及图 3)。

表 2 血浆血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 、血清一氧化氮含量和 B 族 iv 型清道夫受体的 mRNA 及蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	Ang $\text{Ang}(\text{I})$ ($\mu\text{g/L}$)	NO (mmol/L)	SR-Biv mRNA	SR-Biv 蛋白
对照组	60	50.85 \pm 12.15	26.60 \pm 6.72	5.15 \pm 1.15	1.02 \pm 0.23
高脂组	80	92.13 \pm 22.27 ^b	41.61 \pm 14.28 ^b	2.51 \pm 0.67 ^a	0.24 \pm 0.05 ^b

a 为 P < 0.05, b 为 P < 0.01, 与对照组比较。

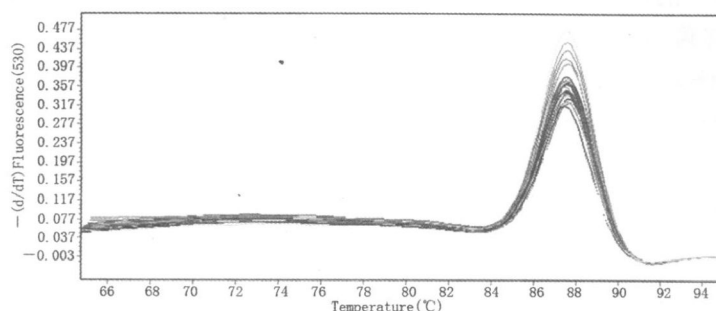


图 1 血小板 B 族 iv 型清道夫受体实时 PCR 产物的融解曲线

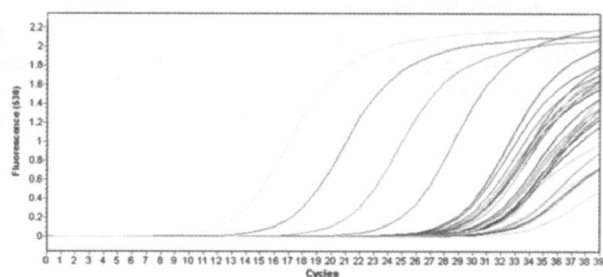


图 2 血小板 B 族 I 型清道夫受体实时 PCR 产物的扩增曲线

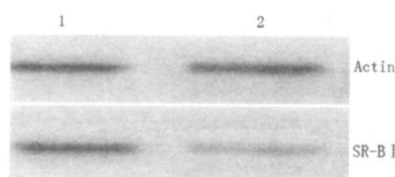


图 3 免疫印迹法检测 B 族 I 型清道夫受体蛋白表达 1 为对照组, 2 为高脂组。

2.4 血管紧张素 Ang II 与 B 族 iv 型清道夫受体表达的相关分析

高脂组 Ang II 与 SR-B iv 的表达呈显著负相关 ($r = -0.488$, $P < 0.05$, 图 4)。

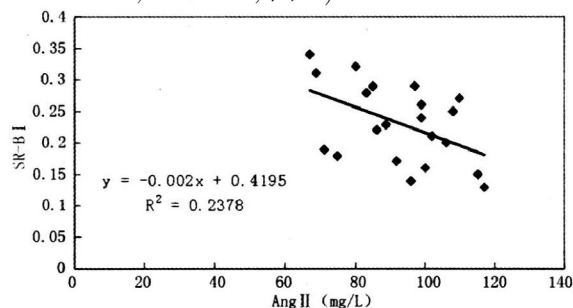


图 4 血管紧张素 Ang II 与 B 族 iv 型清道夫受体表达的关系

3 讨论

血胆固醇升高是 As 的独立危险因素, 脂质代谢

紊乱是 As 的重要发生机制, 内皮细胞损伤是 As 病灶形成的始动环节, 血脂对血管的早期损害主要表现为内皮功能受损。本研究结果表明高胆固醇血症患者内皮衍生性舒血管因子 NO 浓度明显降低, 缩血管因子 Ang II 水平明显增高, 进一步证实高胆固醇血症时存在血管内皮功能障碍。

HDL 将多余胆固醇从周围组织 (包括动脉粥样斑块) 转运到肝脏进行再循环或以胆酸的形式排泄, 这一过程称作胆固醇逆转运 (reverse cholesterol transport RCT)。SR-B iv 是第一个分子和功能定义明确的 HDL 受体, HDL 的抗 As 作用主要基于 HDL 参与的 RCT 过程, 而 SR-B iv 在 RCT 中起着关键作用^[2]。本研究结果表明高胆固醇血症患者血小板 SR-B iv 的 mRNA 和蛋白表达、血清 HDL 水平均明显低于正常对照组, 这将有利于 As 病变的形成。SR-B iv 抗 As 的机制主要为: RCT 的两个方面都需要 SR-B iv 的参与, 即外周组织中游离胆固醇流向 HDL 和 HDL 胆固醇酯经 SR-B iv 介导转运至肝脏用于合成胆汁酸^[3], 这是 SR-B iv 抑制 As 斑块形成的重要机制。④SR-B iv 介导内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 的激活, HDL 通过 SR-B iv 在胞膜小凹陷处聚集, 通过神经酰胺作用激活位于小窝处的 eNOS, 刺激内皮细胞产生 NO, 对血管产生保护作用^[4]。高胆固醇血症患者 SR-B iv 表达及血清 HDL 水平降低, 将导致 RCT 减少和 eNOS 活性下降, NO 产生减少, 从而促进 As 病变的发生。

既往的研究显示, RAS 参与了 As 的发生过程^[5], 其主要活性成分 Ang II 对 SR-B iv 的表达具有调节作用。Wolf 等^[6]的研究首次发现, Ang II 能下调近端肾小管细胞 HDL 受体 SR-B iv 的表达。本研究结果表明, 高胆固醇血症患者血小板 SR-B iv 的表达与血浆 Ang II 水平呈显著负相关, 提示高胆固醇血症患者血小板 SR-B iv 表达的降低可能与 Ang II 对其表达的下调作用有关。 Ang II 下调血小板 SR-B

iv的机制尚不清楚, Yu等^[7]的研究显示 Ang^⑦下调人脐静脉 SR-Biv的作用与磷脂酰肌醇 3激酶 /Akt/FoxO1途径有关。血管紧张素转化酶抑制剂类药物具有独立改善脂质代谢紊乱作用^[8]。

HDL具有抗 As作用, 升高 HDL和降低 LDL均成为近年来 As防治的热点问题。SR-Biv可以改变细胞膜上的胆固醇分布, 介导胆固醇的摄取及逆向转运, 调节 HDL颗粒的摄取和再分泌^[9]。因而对 HDL受体 SR-Biv的表达和调节进行积极深入研究, 并将其作为开发新型抗 As药物的靶点具有重要意义。

[参考文献]

- [1] Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, et al. Identification of scavenger receptor SR-Biv as a high density lipoprotein receptor [J]. *Science* 1996; **271** (5248): 518-520
- [2] Hersberger M, von Eckardstein A. Modulation of high-density lipoprotein cholesterol metabolism and reverse cholesterol transport [J]. *Handb Exp Pharmacol* 2005; (**170**): 537-561
- [3] 孙琳, 冯惊涛, 易光辉. B类 iv型清道夫受体与胆固醇的双向转运 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (1): 67-70
- [4] Gong M, Wilson M, Kelly T, et al. HDL-associated estradiol stimulates endothelial NO synthase and vasodilation in an SR-Biv-dependent manner [J]. *J Clin Invest* 2003; **111** (10): 1579-587
- [5] Schmieder RE, Hilgers KF, Schlaich MP, et al. Renin-angiotensin system and cardiovascular risk [J]. *Lancet* 2007; **369** (9568): 1208-219
- [6] Wolf G, Wenzel U, Jablonski K, et al. Angiotensin ^① down-regulates the SR-Biv HDL receptor in proximal tubular cells [J]. *Nephrol Dial Transplant* 2005; **20** (6): 1222-227
- [7] Yu X, Murao K, Machi H, et al. Regulation of scavenger receptor class Biv gene expression by angiotensin ^① in vascular endothelial cells [J]. *Hypertension* 2007; **49** (6): 1378-384
- [8] 杨沿浪, 张道友, 陈卫东, 等. 高脂血症患者血浆血管紧张素 ^①水平与其血小板 1型受体表达的相关性 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, **16** (6): 476-478
- [9] 刘杰, 汤诺, 沈琳, 等. 清道夫受体 Biv与脂质代谢的相关研究 [J]. *中国医药导刊*, 2008, **10** (8): 1218-220

(此文编辑 许雪梅)

• 读者 • 作者 • 编者 •

欢迎投稿! 欢迎订阅! 欢迎引用! 欢迎刊登广告!

《中国动脉硬化杂志》

中文核心期刊

作为专业性极强的高级学术期刊,《中国动脉硬化杂志》主要刊载国内外防治动脉硬化性疾病(如高脂蛋白血症、动脉粥样硬化、冠状动脉疾病、高血压、缺血性脑血管病和其它动脉硬化性疾病)中的研究论文(含流行病学研究、实验研究、临床研究和方法学研究)。长期以来,以办刊严谨、内容丰富、编排新颖、对稿件处理快速及时、文章发表周期短、可读性强而深受广大作者和读者厚爱。现为中文核心期刊、科技部《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、中国科学院《中国科学引文数据库》来源期刊和《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊,被美国《化学文摘(CA)》俄罗斯《文摘杂志(AJ)》和国内全部数据库收录。现为月刊,每月26日出版, A4开本,高档双胶纸印刷。定价11元,全年132元。由湖南省报刊发行局发行,医药卫生类,邮发代号42-165。《中国动脉硬化杂志》热忱欢迎海内外同仁和社会各届朋友向《中国动脉硬化杂志》投稿,到当地邮局订阅。若错过邮局征订日期,可直接写信和邮汇订购费到编辑部补办订购手续。为感谢广大作者和读者对本刊的支持,自2009年1月1日起,凡在《中国动脉硬化杂志》上发表的论文被SCI和EI源刊引用,论文第一作者和引用者凭当期封面、目次页和文章的复印件可获南华大学期刊社一定金额的现金奖励。

主编杨永宗教授和编辑部主任李小玲副教授率全体办刊人员向长期关心、爱护和支持《中国动脉硬化杂志》的海内外同仁和社会各界朋友致以衷心的感谢! 祝愿您健康长寿,万事如意!