

KIF16B 可能参与 LDLR 在体外培养的肝细胞膜上的分布

邵惊琦¹, 蒋素素¹, 赵倩¹, 袁育林¹, 袁凌志¹, 龙石银¹, 尹卫东¹, 张彩平¹, 廖端芳²

(1. 南华大学衡阳医学院生物化学与分子生物学教研室, 湖南省衡阳市 421001; 2. 湖南中医药大学
湘产大宗药材品质评价湖南省重点实验室, 湖南省长沙市 410208)

[关键词] 驱动蛋白; 驱动蛋白 16B; 低密度脂蛋白受体; LDLR 诱导降解蛋白; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探究驱动蛋白超家族成员 16B(KIF16B)在低密度脂蛋白受体诱导降解蛋白(IDOL)调节肝细胞摄取低密度脂蛋白胆固醇(LDLC)中的作用。方法 干扰/过表达 IDOL(RNAi/OE-IDOL)的慢病毒感染 HepG2 和 LO2 细胞,通过倒置荧光显微镜来观测病毒感染效果;油红 O 染色观察细胞内脂质蓄积水平;DiI 荧光染料标记的 LDL(DiI-LDL)摄取实验检测肝细胞对 LDLC 的摄取能力,流式细胞术检测肝细胞表面低密度脂蛋白受体(LDLR)丰度;Western blot 检测 IDOL、KIF16B 及 LDLR 蛋白的表达变化,并免疫共沉淀进一步检测蛋白之间的相互作用。结果 两种感染慢病毒的肝细胞内均显示绿色荧光,提示 RNAi/OE-IDOL 的慢病毒已感染 HepG2 和 LO2 细胞;与无慢病毒感染的 Control 组比较,OE-IDOL 组的细胞内脂质含量显著减少($P < 0.05$),LDLC 的摄取显著减弱($P < 0.05$),且肝细胞表面 LDLR 丰度显著降低($P < 0.01$);RNAi-IDOL 组的细胞内脂滴含量显著增加($P < 0.01$),LDLC 摄取增强,且肝细胞表面 LDLR 丰度显著增高($P < 0.01$);与慢病毒载体的 Control 组比较,RNAi-IDOL 组 LDLR 蛋白和 KIF16B 蛋白的表达升高($P < 0.01$),且 KIF16B 与 LDLR 的相互作用增强;OE-IDOL 组 LDLR 蛋白和 KIF16B 蛋白的表达降低($P < 0.05$),LDLR 与 KIF16B 相互作用随之减弱。结论 IDOL 调节的肝细胞摄取 LDLC 的过程可能与 KIF16B 跟 LDLR 之间存在相互作用有关。

[中图分类号] R363;R5

[文献标识码] A

KIF16B may participate in the distribution of LDLR on the cell membrane

SHAO Jingqi¹, JIANG Susu¹, ZHAO Qian¹, YUAN Yulin¹, YUAN Lingzhi¹, LONG Shiyin¹, YIN Weidong¹, ZHANG Caiping¹, LIAO Duanfang²

(1. Department of Biochemistry & Molecular Biology, Hengyang Medical College, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Key Laboratory for Quality Evaluation of Bulk Herbs of Hunan Province, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[KEY WORDS] kinesin; KIF16B; low density lipoprotein receptor; inducible degradation of LDLR; atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To confirm the role of kinesin superfamily member 16B (KIF16B) in the process of low density lipoprotein cholesterol (LDLC) uptake of hepatocyte which is regulated by the inducible degradation of low density lipoprotein receptor (IDOL). **Methods** The intracellular fluorescence intensity was observed by the inverted fluorescence microscope. The intracellular lipid content was measured by oil red O staining, and the LDLC uptake was detected by DiI-LDL uptake experiment. The low density lipoprotein receptor (LDLR) abundances on the cell surface of hepatocytes were assayed by immune flow cytometry. The protein expression of IDOL, KIF16B and LDLR was detected by Western blot, and the interaction between LDLR and KIF16B protein was carried out by co-immunoprecipitation. **Results** Compared with white light view, the observed green fluorescence results showed that both HepG2 and LO2 cells were infected by the RNA-interference or overexpression IDOL(RNAi/OE-IDOL) lentivirus. Compared with the non-lentivirus infected control group, both the intracellular lipid and the ability of the LDLC uptake were significantly decreased in the OE-IDOL group ($P < 0.05$), and also decreased in the abundances of LDLR on the surface of hepatocytes ($P < 0.01$); and vice

[收稿日期] 2021-02-28

[修回日期] 2021-06-02

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81670268,81600291);湖南省自然科学基金项目(2018JJ2348,2018JJ2346)

[作者简介] 邵惊琦,硕士研究生,研究方向为脂蛋白与动脉粥样硬化,E-mail 为 15580337420@163.com。通信作者张彩平,博士,副教授,硕士研究生导师,研究方向为脂蛋白与动脉粥样硬化,E-mail 为 zhangcpin@163.com。

versa, the contrary results of these three experiments were observed in the RNAi-IDOL group ($P < 0.01$), which indicated that overexpression IDOL would reduce the LDLC uptake of hepatocytes. Compared with the RNAi/OE-IDOL control group, the expression of LDLR and KIF16B protein was increased in the RNAi-IDOL group ($P < 0.01$), and the interaction between KIF16B and LDLR was enhanced ($P < 0.01$). While in the overexpression IDOL of HepG2 and LO2 cells, the expression of LDLR and KIF16B protein was decreased ($P < 0.05$), meanwhile the interaction between LDLR and KIF16B was correspondingly weakened. **Conclusion** The interaction between KIF16B and LDLR possibly affects the process of that IDOL regulates LDLC uptake of hepatocytes.

动脉粥样硬化是心血管疾病常见的病理基础^[1],脂质代谢异常与动脉粥样硬化的发生发展密切相关^[2-6]。血液中的低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)主要由肝细胞表面低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)介导,通过内吞作用来清除^[7]。细胞膜 LDLR 的丰度减少会导致血液中总胆固醇浓度升高,最终导致家族性高胆固醇血症和早发性动脉粥样硬化^[8-9]。有研究证明,具有 E3 泛素连接酶活性的 LDLR 诱导降解蛋白(inducible degrader of the LDLR, IDOL)在转录后水平通过诱导 LDLR 泛素化经溶酶体途径降解,减弱了 LDLR 摄取、代谢血浆 LDLC 的能力^[10]。目前鲜有报道关于 IDOL 使细胞膜表面的 LDLR 丰度减少的机制。

驱动蛋白是沿着微管网络运输货物的“分子马达”,它通过催化三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)水解并将释放的化学能转化为机械能为“货物”运输提供动力^[11]。KIF16B 是驱动蛋白 3 家族的成员,它的特别之处在于其 C 末端带有一个 phox-homology(PX)结构域,该结构域能够结合早期内体并驱动其运输^[12]。KIF16B 参与细胞内多种大分子物质的转运,引发我们进一步探究 KIF16B 是否参与了抑制 IDOL 后促进 LDLR 摄取 LDLC 的这一过程。

本文在干扰/过表达 IDOL(RNAi/OE-IDOL)慢病毒感染的 HepG2 及 LO2 两种肝细胞模型的基础上,通过检测细胞内脂滴以及 LDLR 对 LDLC 的摄取能力,明确 IDOL 可抑制肝细胞 LDLR 对 LDLC 的摄取能力;并通过检测 LDLR、IDOL 及 KIF16B 的表达及其之间的相互作用关系,确定 KIF16B 在 IDOL 调节肝细胞摄取 LDLC 中的作用,以期心血管疾病药物治疗靶标提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

特级胎牛血清购于杭州天杭生物有限公司;

HepG2(肝癌细胞)和 LO2(正常肝细胞)均购于中科院上海生化与细胞研究所细胞库;BCA 蛋白质定量试剂盒(P0012)购于上海碧云天生物技术有限公司;羊抗 LDLR 抗体(AF2148)购于 R&D 公司,兔抗 IDOL 抗体(ab74562)和 HRP 标记的羊抗兔二抗(ab181662)均购于艾博抗(上海)贸易有限公司;鼠抗 KIF16B 抗体(sc-390309)、HRP 标记的羊抗鼠二抗(sc-2005)均购于 Santa Cruz 公司;兔抗 β -actin13E5 抗体(4970)购于美国 CST 公司;HRP 标记的驴抗羊二抗(abs20205)、PIPA 裂解液(Strong)(abs47014877)均购于爱必信(上海)生物科技有限公司;人源性 LDL(YB-001)购于广州奔源生物科技有限公司;油红 O 粉末(0684)购于美国 VWR Life Science AMRESCO 公司;苏木精染液(H8070)、4% 组织细胞固定液(P1110)、Hoechst33342(B8040)和 DiI-LDL(L8930)均购于索莱宝(北京)科技有限公司;RNAi/OE-IDOL 慢病毒载体(GV358/GV248)购于上海吉凯基因有限公司;Pierce™ Classic Magnetic IP/Co-IP Kit(88804)购于 Thermo Scientific 公司;其余均为进口或国产分析纯试剂。

1.2 干扰 IDOL、过表达 IDOL 慢病毒感染 HepG2 和 LO2 细胞

取对数生长期状态良好的 HepG2 和 LO2 两种细胞悬液,按每孔 5×10^4 个细胞加入 6 孔板中,使其贴壁生长 24 h,使感染时细胞为 50% 左右。根据课题组预实验慢病毒感染操作条件^[12],分别加入过表达及干扰 IDOL 慢病毒稀释液培养 12 h 后更换为没有病毒的普通培养基,48 h 后每孔加入 5 mg/L 嘌呤霉素共同培养 3~4 天,更换为原培养基,将经嘌呤霉素筛选后的贴壁细胞转移至新细胞培养瓶进行实验。

1.3 荧光显微镜检测

慢病毒感染细胞后,待其生长至细胞状态良好,瓶中细胞为 80% 左右,用封口膜密封细胞培养瓶瓶口,置于倒置荧光显微镜下观察。慢病毒载体的标签蛋白 GFP 在蓝色激发光下能够呈现绿色荧光,分别将各组细胞在镜下观察荧光强度后拍摄图

片,保存。

1.4 油红 O 实验

灭菌方形盖玻片事先置于 6 孔板内,取对数生长期肝细胞,按照每孔 1×10^5 个均匀接种到 6 孔板中,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养至细胞贴壁生长,除 Basal 组(不加实验处理的细胞分组)外,其余各组均加入 25 mg/L 的 LDL 模拟细胞荷脂环境,继续孵育 24 h,沿孔板边缘加入 1 mL 预冷的 PBS 轻轻洗涤 3 次,然后加入 4% 细胞组织固定液室温固定 35 min,油红 O 工作液染色 5~8 min,苏木精染液复染细胞核 30 s,在载玻片上滴加一滴无水甘油,将孔板内盖玻片小心取出并倒扣于载玻片上,光学倒置显微镜下可见细胞内红色脂滴,拍片分析。

1.5 DiI-LDL 检测 LDL 的摄取

取对数生长期肝细胞,制备成每毫升包含 2×10^5 个细胞的悬液,按照每孔 500 μL 悬液均匀接种到 24 孔板中。将细胞培养板置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中 24 h 后,选用 25-羟基胆固醇(25-HC)作为阴性对照,脂蛋白缺乏性血清(LPDS)作为阳性对照,除 Basal 组外,其余各组加入 DiI-LDL 10 mg/L,共孵育 4 h,至此步骤开始全程避光操作;预冷 PBS 轻柔洗涤 3 次,去除 PBS 后加入 500 μL 每孔含 0.4% 牛血清白蛋白的 PBS 洗 3 次,每次洗涤 10 min;去除 PBS 后加入 4% 细胞组织固定液室温固定 10 min,去除固定液后每孔用 PBS 洗 3 次;去除 PBS 后加 Hoechst33342 室温染色 20 min,PBS 洗 3 次;弃去孔中染液,每孔滴加 1 滴抗荧光淬灭液;置于荧光显微镜下观察调节,绿色激发光激发 DiI 显示红色荧光,紫色激发光激发细胞核显示蓝色荧光,拍摄图片,保存。

1.6 流式细胞术检测

取对数生长期肝细胞,按每孔 1.5×10^6 个制备细胞悬液,置于 EP 管中 1 500 r/min 离心 3 min,弃上清液后每管加入 1 mL PBS 轻柔吹匀,1 500 r/min 离心 3 min;去除上清后加入 500 μL 每管含 0.5% 牛血清白蛋白的 PBS 共孵育封闭,室温置于摇床上慢速摇匀封闭 30 min;1 500 r/min 离心 3 min 后 PBS 清洗一次,每管加入 LDLR 一抗(1:200)200 μL ,室温置于摇床上慢速摇匀孵育 1 h;1 500 r/min 离心 3 min 后 PBS 洗 2 次,每管加入特异性荧光二抗(1:500)200 μL ,此步骤开始全程避光操作,室温置于摇床上慢速摇匀孵育 30 min;1 500 r/min 离心 3 min 后 PBS 清洗 1~2 次后加入 PBS 轻轻混匀制成细胞悬液,在流式细胞仪上检测保存结果,Flow

Jo 软件分析。

1.7 Western blot 检测

收集对数生长期细胞用细胞刮子收集细胞,加入细胞裂解液[1 000 μL RIPA(strong)+5 μL PMSF+10 μL cocktail],冰上裂解半小时,离心后取上清液,BCA 测定其蛋白的含量,按每孔 30 μg 蛋白质总量上样,经 SDS-PAGE 电泳分离后,300 mA 转膜 3 h,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,检测 LDLR、KIF16B、IDOL 蛋白表达,其中抗体孵育稀释比为:LDLR 一抗 1:250,LDLR 二抗 1:1 000;KIF16B 一抗 1:100, KIF16B 二抗 1:500;IDOL 一抗 1:500, β -actin 一抗 1:1 000,IDOL 和 β -actin 二抗 1:2 000。

1.8 免疫共沉淀

去除培养瓶内培养基,用预冷的 PBS 洗 2 次,加入免疫沉淀裂解液,混匀,冰上孵育,将裂解液按 13 000 r/min 离心 10 min 取上清稀释至 500 μL , 4°C 过夜。加入 Pierce 蛋白 A/G 的磁珠涡旋混匀,置于磁力架内,去除上清。将抗原样本与抗体混合物加入离心管保持混匀,室温下共孵育 1 h。用磁力架收集磁珠,并洗涤 3 次,加入低 pH 洗脱液进行洗脱后用 WB 检测蛋白之间相互作用结果。共沉淀时,IP-IgG 组每 700 μg 总蛋白加入 5 μL Normal IgG; IP-KIF16B 组每 700 μg 总蛋白加入 20 μL KIF16B 一抗;IP-LDLR 组每 700 μg 总蛋白加入 5 μL LDLR 一抗。

1.9 统计学分析

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 GraphPad Prism 6.02、Image J、Flow jo 统计软件进行数据分析,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 干扰/过表达 IDOL 慢病毒感染 HepG2/LO2 细胞的荧光检测

将慢病毒感染后存活状态良好的细胞置于倒置荧光显微镜下观测,观察正常视野中的细胞形态与蓝色激发光照射下的绿色荧光效果,结果显示:镜下在相同视野下对比可以看到,各组 HepG2 和 LO2 细胞内均带有绿色荧光(图 1),提示慢病毒已感染 HepG2 和 LO2 细胞。

2.2 IDOL 对 HepG2/LO2 细胞内脂质含量和 LDLC 摄取的影响

为了进一步探究 IDOL 表达水平的变化对肝细

胞内脂质含量和摄取 LDLC 能力的影响,本研究采用油红 O 染液对细胞内脂滴进行染色,并通过 DiI 红色荧光染料标记的 LDL 进行实验。结果显示: HepG2 细胞中,与无慢病毒感染的 Control 组相比, OE-IDOL 组脂滴含量和摄取 LDLC 减少 ($P < 0.01$), RNAi-IDOL 组脂滴含量和摄取 LDLC 的荧光强度增多 ($P < 0.01$; 图 2 和图 3)。同样在 LO2 细胞中,与无慢病毒感染的 Control 组相比, OE-IDOL 组脂滴含量和摄取 LDLC 显著减少 ($P < 0.05$), RNAi-IDOL 组脂滴含量和摄取 LDLC 的荧光强度增多 ($P < 0.01$; 图 2 和图 3)。结果表明 IDOL 表达水平的增高会使肝细胞内脂质含量减少,而 IDOL 表达水平的降低会导致肝细胞内脂质含量增多。

2.3 IDOL 对 HepG2/LO2 细胞表面 LDLR 丰度的影响

流式细胞仪检测肝细胞表面 LDLR 丰度,结果显示:在 HepG2 和 LO2 细胞中,与无慢病毒感染的 Control 组相比, RNAi-IDOL 组中 LDLR 荧光明显增强 ($P < 0.01$, 图 4), OE-IDOL 组中荧光强度降低 ($P < 0.01$, 图 4),提示 IDOL 会降低肝细胞膜上 LDLR 分布。

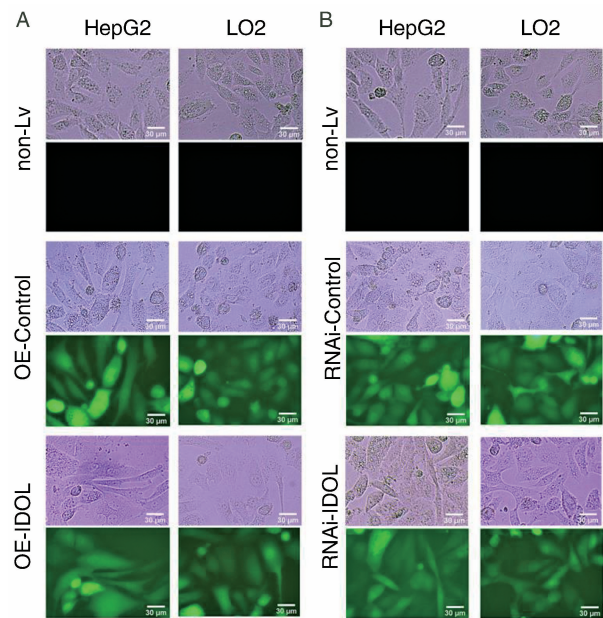


图 1. 获得慢病毒感染的 HepG2 和 LO2 细胞
A 为 OE-IDOL, B 为 RNAi-IDOL。
Figure 1. HepG2 and LO2 cells infected with lentivirus had been obtained

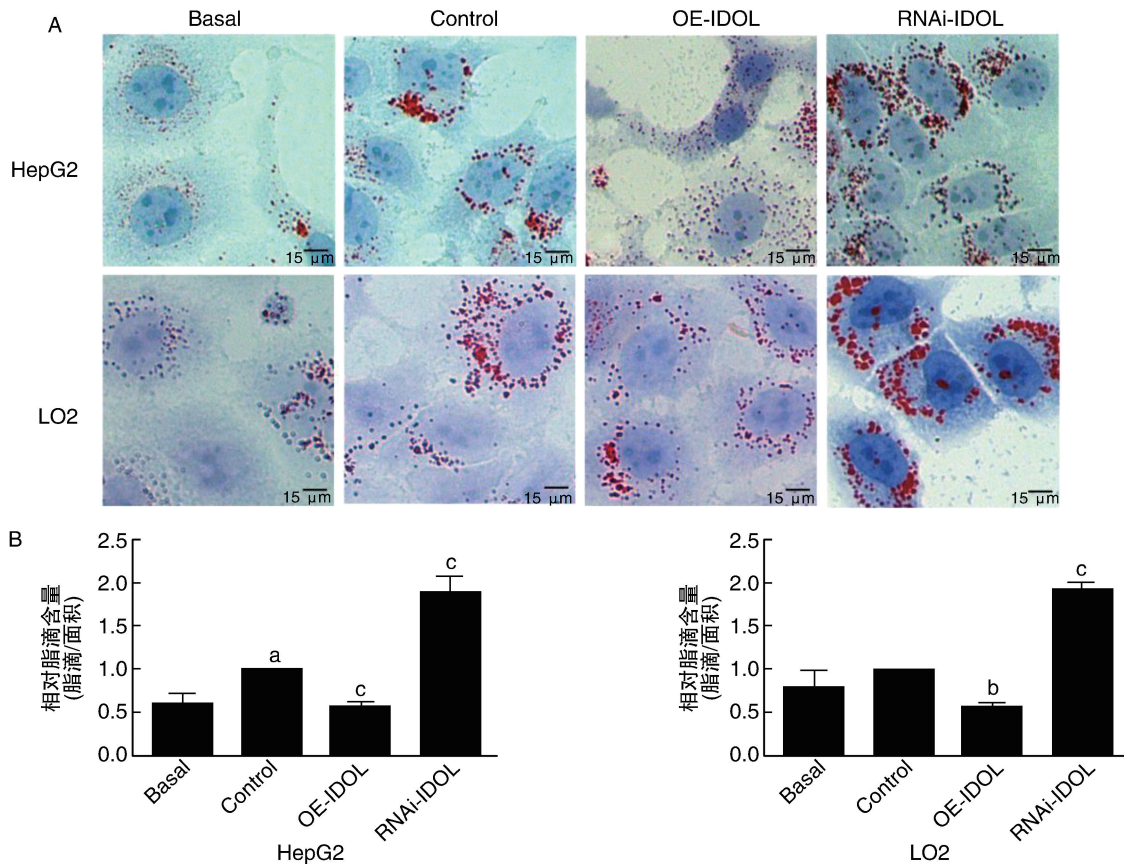


图 2. 油红 O 染色检测 IDOL 对肝细胞内脂滴含量的影响 ($n = 3$)

A 为油红 O 染色形态图, B 为油红 O 染色半定量结果。Basal 组为不加实验处理的细胞分组, 此处为不加 LDL 进行荷脂的细胞组。a 为 $P < 0.05$, 与 Basal 组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与无慢病毒感染的 Control 组比较。

Figure 2. The effect of IDOL on the content of lipid droplets in hepatocytes was detected by oil red O staining ($n = 3$)

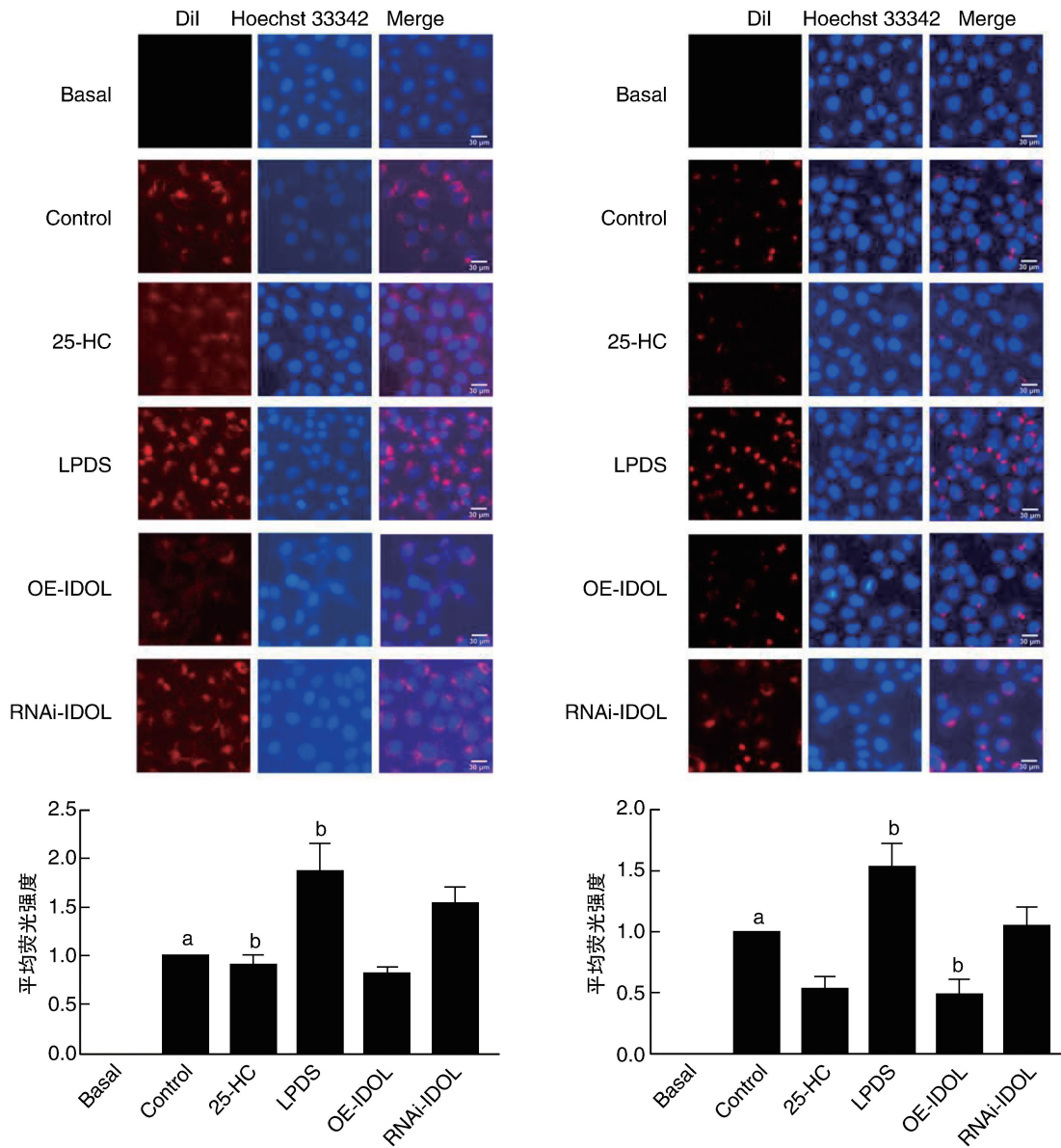


图 3. IDOL 对肝细胞摄取 DiI-LDL 能力的影响 (n=3)

左图为 HepG2 细胞形态及半定量统计结果,右图为 LO2 细胞形态及半定量统计结果。Basal 组为不加实验处理的细胞分组,此处为不加 DiI-LDL 的细胞组。a 为 $P < 0.01$,与 Basal 组比较;b 为 $P < 0.05$,与无慢病毒感染 Control 组比较。

Figure 3. The effect of IDOL on the uptake of DiI-LDL by hepatocytes (n=3)

2.4 IDOL 对 HepG2/LO2 细胞中 LDLR 和 KIF16B 蛋白表达的影响

进一步探究了 IDOL 表达水平对 LDLR 和 KIF16B 蛋白表达水平的影响。在 HepG2 细胞中,与 OE-Control 组相比,OE-IDOL 组 IDOL 蛋白表达升高,LDLR 蛋白表达降低,但两者表达变化差异均无显著性 ($P > 0.05$),同时 KIF16B 表达水平显著降低 ($P < 0.01$;图 5A);而与 RNAi-Control 组相比,RNAi-IDOL 组 IDOL 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$),同时 LDLR 蛋白表达无显著差异性升高 ($P > 0.05$),

KIF16B 表达显著升高 ($P < 0.01$;图 5A)。在 LO2 细胞中,RNAi-IDOL 组中 IDOL 表达显著降低 ($P < 0.01$),LDLR 和 KIF16B 表达升高,但差异无显著性 ($P > 0.05$;图 5B);而 OE-IDOL 组中,IDOL 表达无显著差异性升高 ($P > 0.05$),同时 LDLR 和 KIF16B 表达显著降低 ($P < 0.05$;图 5B)。由此说明,IDOL 表达水平的升高会导致细胞内 LDLR 和 KIF16B 表达水平的降低,继而降低细胞对脂质的摄取;IDOL 表达水平的降低会使细胞内 LDLR 和 KIF16B 表达水平升高,从而增加细胞对脂质的摄取。

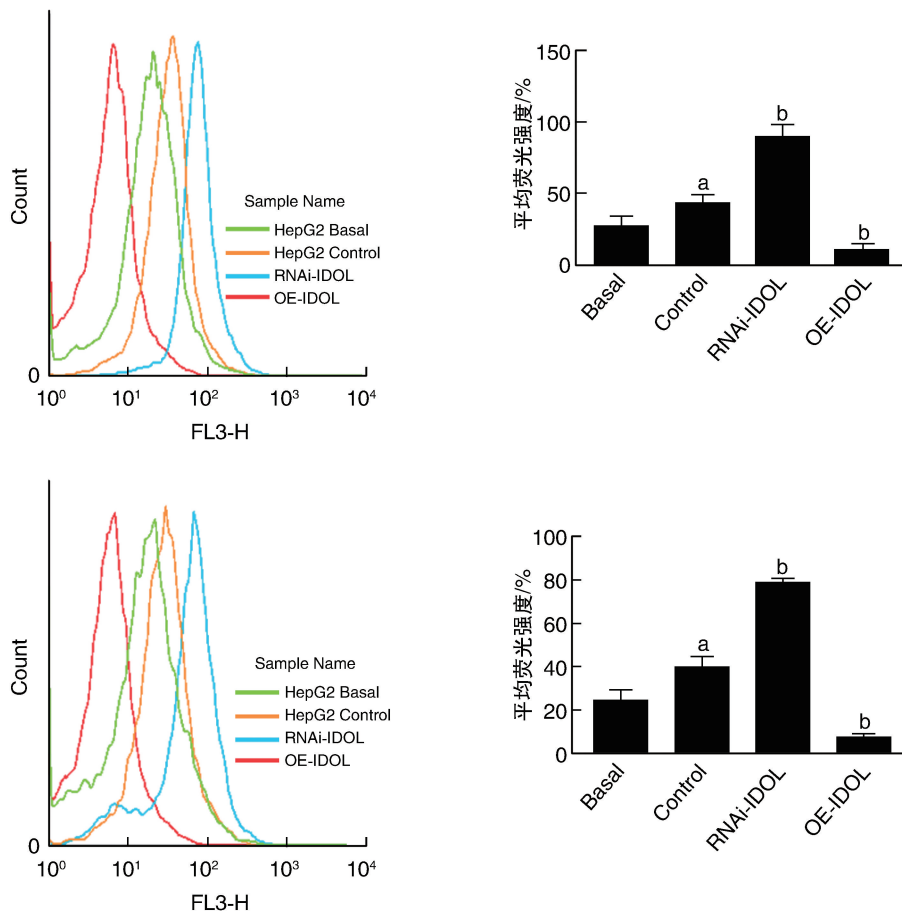


图 4. 流式细胞术检测 IDOL 对肝细胞表面 LDLR 丰度的影响 ($n=3$)
 上图为 HepG2 细胞, 下图为 LO2 细胞。a 为 $P<0.01$, 与 Basal 组比较; b 为 $P<0.01$, 与无慢病毒感染的 Control 组比较。

Figure 4. The effect of IDOL on the abundance of LDLR on hepatocyte surface was detected by flow cytometry

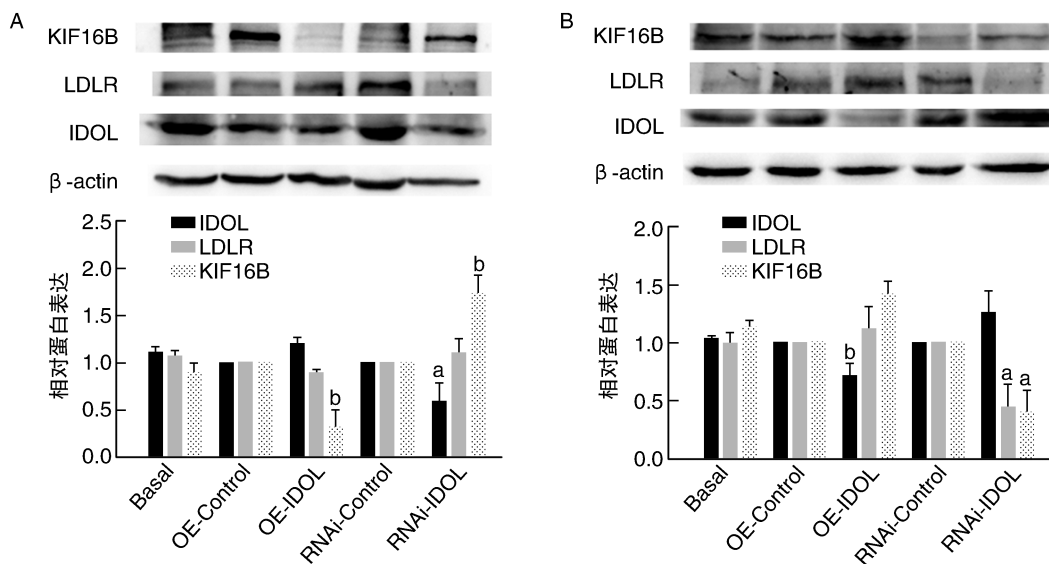


图 5. Western blot 检测 IDOL 对肝细胞中 LDLR 和 KIF16B 蛋白表达的影响 ($n=3$)
 A 为 HepG2 细胞, B 为 LO2 细胞。a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与 OE-Control 组或 RNAi-Control 组比较。

Figure 5. The effect of IDOL on the expression of LDLR and KIF16B protein in hepatocytes was detected by Western blot ($n=3$)

2.5 免疫共沉淀检测 LDLR 与 KIF16B 间的相互作用

以上结果证实肝细胞中, IDOL 表达水平会影响 LDL 和 KIF16B 蛋白表达水平, 并且进一步影响肝细胞对 LDLC 的摄取能力, 那么 LDLR 与 KIF16B 在细胞内是否存在相互作用? 本文通过免疫共沉淀实验进一步进行验证, 结果显示: 在 HepG2 细胞

中, 与 RNAi-Control 组相比, RNAi-IDOL 组 KIF16B 与 LDLR 相互作用显著增强了 2 倍 ($P < 0.01$, 图 6), 而与 OE-Control 组相比, OE-IDOL 组 KIF16B 与 LDLR 相互作用显著减弱了 40% ($P < 0.01$, 图 6); 同样地, 在 LO2 细胞中 KIF16B 与 LDLR 存在相互作用(图 6)。

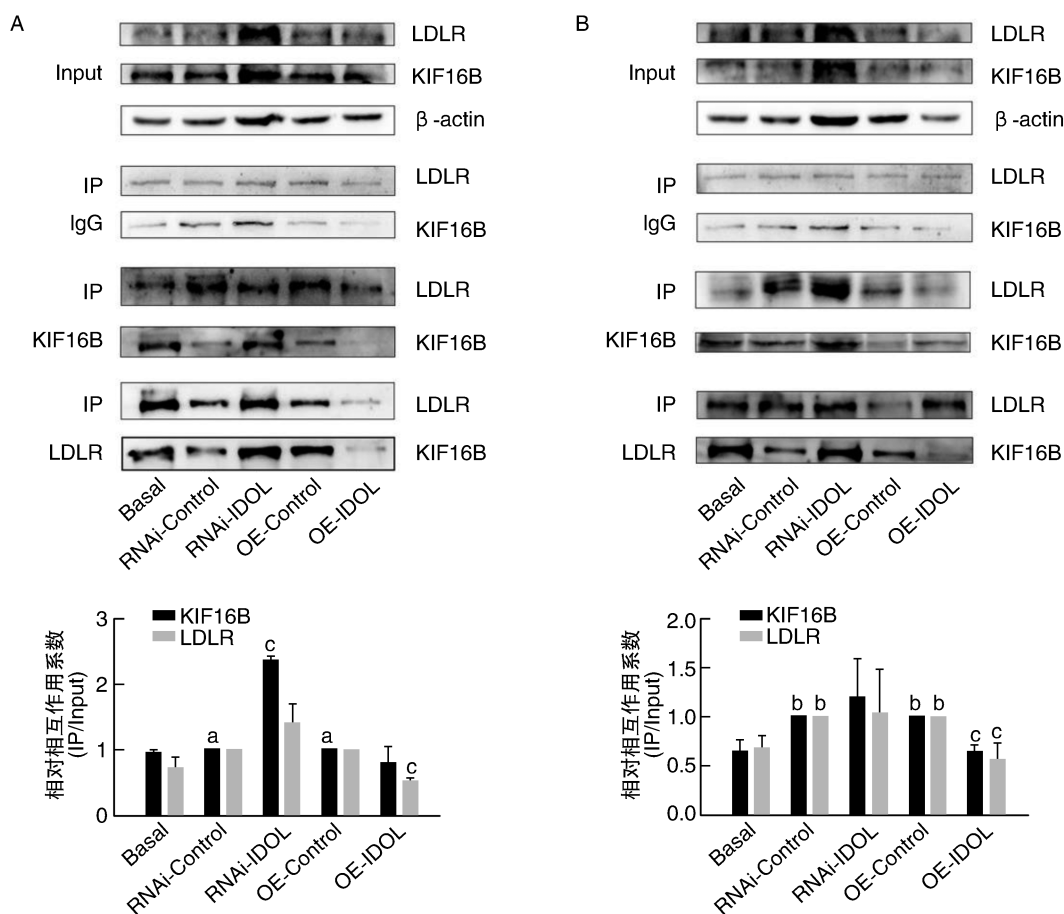


图 6. LDLR 与 KIF16B 之间存在相互作用 ($n=3$)

A 为 HepG2 细胞, B 为 LO2 细胞。Input 为细胞全裂解液组分, IP-IgG 为与 Normal IgG 抗体共孵育, IP-KIF16B 为 KIF16B 抗体共孵育, IP-LDLR 为与 LDLR 抗体共孵育。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与 Basal 组比较; c 为 $P < 0.01$, 与 RNAi-Control 组或 OE-Control 组比较。

Figure 6. The interaction between LDLR and KIF16B ($n=3$)

3 讨论

动脉粥样硬化性心血管疾病 (ASCVD) 为全球高发病率和死亡率的主要原因^[13], 其中脂质在动脉血管壁中的沉积和氧化是动脉粥样硬化形成的始动环节之一^[14], 控制血浆脂质水平也是临床工作中对心血管事件治疗方案的主要考量指标^[15-16]。人体肝脏是脂蛋白合成和代谢的主要承担者, 血浆 LDLC 有 70% 是通过肝细胞膜表面的 LDLR 结合并内吞进行清除^[17]。基于此, 本文选取 HepG2 和 LO2

两种肝细胞作为研究对象, 并利用 LDLC 进行荷脂, 模拟人体内 LDLR 表达水平对肝细胞摄取 LDLC 的影响。

LDLR 缺陷是引起家族性高胆固醇血症最常见的原因, 因此它在哺乳动物细胞内的表达受到严格的调控^[18]。IDOL 是 LDLR 转录后水平调控因子之一, 其通过 FERM 结构域与 LDLR 的 C 端尾部结合, 介导 LDLR 泛素化经溶酶体降解^[19]。本文利用过表达和 RNA 干扰 IDOL 的慢病毒感染体外培养的 HepG2 和 LO2 两种肝细胞, 探究 IDOL 对肝细胞

LDLR 摄取 LDLC 的调节作用。荧光显微镜下呈现绿色荧光,表明获得过表达及干扰 IDOL 的慢病毒感染感染的两种肝细胞。

为了检测 IDOL 的表达水平对肝细胞内脂质水平的影响,利用油红 O 染色进行评估,发现 IDOL 高表达时,细胞内脂滴含量减少,而 IDOL 被敲低时细胞内脂滴含量增多。为了明确脂滴的增多是由于肝细胞摄取 LDLC 的能力增强,我们通过常用亲脂荧光染料 DiI^[20] 标记 LDL,使我们可以通过荧光强度直观观察肝细胞摄脂能力的变化,可以观察到 IDOL 表达水平会影响肝细胞摄取 LDLC 的能力,当过表达 IDOL 时肝细胞摄取 LDLC 的能力会减弱,与已报道的 IDOL 高表达后血脂升高的结果一致^[21]。

肝细胞内脂滴增多、脂质摄取能力增强与细胞表面 LDLR 能够识别 LDLC 并内吞的过程具有密切的联系,为了探究 IDOL 对肝细胞膜 LDLR 分布的影响,我们进一步通过流式细胞仪检测 LDLR 分布丰度,发现 IDOL 高表达时,LDLR 的丰度降低,而 IDOL 低表达时,LDLR 的丰度相应增高。此结果验证了 IDOL 促进 LDLR 降解,从而减少肝细胞膜表面 LDLR 数量这一理论^[22]。

LDLR 在心血管疾病中的作用已被广泛研究^[23],然而其再循环回质膜表面的分子机制尚未完全明确。细胞的内吞作用和再循环过程使细胞质膜处于一种动态平衡中^[24],肝细胞表面的多种受体(例如低密度脂蛋白受体、酪氨酸激酶受体、G 蛋白偶联受体、转铁蛋白受体等)在经历内吞作用进入细胞后可以再循环回细胞表面,以便它们重复结合配体,完成内吞循环^[25]。这种动态平衡系统不仅需要严格的监管,还需要特殊的蛋白分子为受体循环运输提供能量。驱动蛋白可以通过水解 ATP 释放的能量,为货物结合微管并沿着微管骨架运动提供运输动力^[26]。其中 KIF16B 是驱动蛋白 3 超家族中的重要成员,在包括肝细胞在内多种人体细胞中均有表达,能够结合运输“货物”的“卡车”-内体囊泡,从靠近细胞核处的微管负端将其运输到靠近细胞质膜的微管正端,并为运输过程提供动力^[11-12,27],因此引发我们关注 KIF16B 在 IDOL 调节 LDLR 分布丰度中的作用。通过 Western blot 监测蛋白质表达水平可以发现当 IDOL 表达增高时,LDLR 与 KIF16B 表达降低,本文通过免疫共沉淀进一步探究 LDLR 与 KIF16B 在肝细胞内存在相互作用的可能性。结果显示在肝细胞中,LDLR 与 KIF16B 存在相互作用,且随 IDOL 表达强弱发生变化,高表达 IDOL 时,LDLR 与 KIF16B 的相互作用会降低。

综上所述,在肝细胞内 IDOL 通过降低 LDLR 的表达水平使细胞内脂质含量降低;抑制肝细胞 IDOL 的表达则可提升肝细胞膜 LDLR 分布丰度,促进肝细胞摄取 LDLC,这一过程可能与 KIF16B 促进 LDLR 向膜分布重编程有关,这一研究可望为防治动脉粥样硬化性心血管疾病提供新的理论依据。

[参考文献]

- [1] WOLF D, LEY K. Immunity and inflammation in atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2019, 124(2): 315-327.
- [2] LIBBY P, BORNFELDT K E, TALL A R. Atherosclerosis: successes, surprises, and future challenges[J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 531-534.
- [3] LIBBY P, RIDKER P M, HANSSON G K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis[J]. *Nature*, 2011, 473(7347): 317-325.
- [4] WU M Y, LI C J, HOU M F, et al. New insights into the role of inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(10): 2034.
- [5] 赵战芝,姜志胜. 我国动脉粥样硬化基础研究几个热点领域的新进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(8): 645-654.
- [6] 郭明秋,殷晓捷,刁殿琰,等. 脂质代谢水平与冠状动脉粥样硬化病变的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(2): 149-155.
- [7] YANG H X, ZHANG M, LONG S Y, et al. Cholesterol in LDL receptor recycling and degradation[J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 500: 81-86.
- [8] HOPKINS P N, TOTH P P, BALLANTYNE C M, et al. Familial hypercholesterolemias: prevalence, genetics, diagnosis and screening recommendations from the National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia[J]. *J Clin Lipidol*, 2011, 5(3 Suppl): S9-S17.
- [9] TALMUD P J, FUTEMA M, HUMPHRIES S E, et al. The genetic architecture of the familial hyperlipidaemia syndromes: rare mutations and common variants in multiple genes[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2014, 25(4): 274-281.
- [10] HONG C, DUIT S, JALONEN P, et al. The E3 ubiquitin ligase IDOL induces the degradation of the low density lipoprotein receptor family members VLDLR and ApoER2[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(26): 19720-19726.
- [11] NIWA S. Kinesin superfamily proteins and the regulation of microtubule dynamics in morphogenesis[J]. *Anat Sci Int*, 2015, 90(1): 1-6.
- [12] LI B J, CHEN H, JIANG S S, et al. PX Domain-containing kinesin KIF16B and microtubule-dependent intracellular movements[J]. *J Membr Biol*, 2020, 253(2): 101-108.

- [13] KINOSHITA M, YOKOTE K, ARAI H, et al. Japan Atherosclerosis Society (JAS) guidelines for prevention of atherosclerotic cardiovascular diseases 2017 [J]. *Atheroscler Thromb*, 2018, 25(9): 846-984.
- [14] WITZTUM J L, LICHTMAN A H. The influence of innate and adaptive immune responses on atherosclerosis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2014, 9: 73-102.
- [15] MACH F, BAIGENT C, CATAPANO A L, et al. 2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias; lipid modification to reduce cardiovascular risk [J]. *Eur Heart J*, 2020, 41(1): 111-188.
- [16] SCHMIDT A M. Diabetes mellitus and cardiovascular disease [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(4): 558-568.
- [17] KLEIN-SZANTO A J P, BASSI D E. Keep recycling going: new approaches to reduce LDL-C [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 164: 336-341.
- [18] MA S, SUN W, GAO L, et al. Therapeutic targets of hypercholesterolemia: HMGCR and LDLR [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2019, 12: 1543-1553.
- [19] CALKIN A C, GOULT B T, ZHANG L, et al. FERM-dependent E3 ligase recognition is a conserved mechanism for targeted degradation of lipoprotein receptors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(50): 20107-20112.
- [20] YEKTAIEAN N, MEHRABANI D, SEPASKHAH M, et al. Lipophilic tracer DiI and fluorescence labeling of acridine orange used for *Leishmania major* tracing in the fibroblast cells [J]. *Heliyon*, 2019, 5(12): e03073.
- [21] ADI D, LU X Y, FU Z Y, et al. IDOL G51S variant is associated with high blood cholesterol and increases low-density lipoprotein receptor degradation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(12): 2468-2479.
- [22] ZELCER N, HONG C, BOYADJIAN R, et al. LXR regulates cholesterol uptake through IDOL-dependent ubiquitination of the LDL receptor [J]. *Science*, 2009, 325(5936): 100-104.
- [23] SITHU S D, MALOVICHKO M V, RIGGS K A, et al. Atherogenesis and metabolic dysregulation in LDL receptor-knockout rats [J]. *JCI Insight*, 2017, 2(9): e86442.
- [24] GRANT B D, DONALDSON J G. Pathways and mechanisms of endocytic recycling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10: 597-608.
- [25] TAGUCHI T. Emerging roles of recycling endosomes [J]. *Biochem*, 2013, 153: 505-510.
- [26] KEVENAAR J T, BIANCHI S, VAN SPRONSEN M, et al. Kinesin-binding protein controls microtubule dynamics and cargo trafficking by regulating kinesin motor activity [J]. *Curr Biol*, 2016, 26(7): 849-861.
- [27] HIROKAWA N, TANAKA Y. Kinesin superfamily proteins (KIFs): various functions and their relevance for important phenomena in life and diseases [J]. *Exp Cell Res*, 2015, 334(1): 16-25.

(此文编辑 许雪梅)