

## 人清道夫受体 AII 胞外部分在毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中的分泌表达

刘 明 洪 斌\* 巫晔翔 王丽非 司书毅 李 元

(中国协和医科大学中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

**摘 要** 清道夫受体 A (SR-A) 介导巨噬细胞无限制摄取修饰的低密度脂蛋白 (mLDL) 形成泡沫细胞, 继而形成动脉粥样硬化病灶, 在动脉粥样硬化的发生、发展过程中具有重要作用, 被认为是治疗动脉粥样硬化的潜在靶点。本文应用 RT-PCR 方法扩增得到编码人 II 型 SR-A 胞外部分 (shSR-AII) 的 cDNA, 将其克隆至毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 分泌表达载体 pPIC9K 构建重组表达质粒 p9K-shSR-AII。将重组表达质粒线性化后, 电转化毕赤酵母 GS115, 用原位双膜法筛选获得高表达 shSR-AII 的重组菌株 GS115/p9K-shSR-AII。重组菌株经 1% 甲醇诱导, SDS-PAGE、Western blot 分析表明 shSR-AII 获得了分泌表达。Ligand binding blot 结果表明表达的 shSR-AII 具有与配基 oxLDL 结合的生物活性。U937 泡沫细胞模型进一步表明 shSR-AII 可通过竞争性结合 oxLDL 来抑制泡沫细胞的形成, 为以 shSR-AII 为靶点建立抗动脉粥样硬化药物筛选模型奠定了基础。

**关键词** shSR-AII, *Pichia pastoris*, 动脉粥样硬化

**中图分类号** Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)06-0868-07

心血管疾病是当今发病率和死亡率均居前列的主要疾病之一, 动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是其主要病理基础, 修饰的 LDL (modified low density lipoprotein, mLDL) 如氧化的 LDL (oxidized LDL, oxLDL) 则是动脉粥样硬化形成的主要参与者。近年来的研究发现体内 mLDL 致 AS 的作用主要基于 mLDL 参与泡沫细胞形成, 进而形成动脉粥样硬化病灶, 巨噬细胞清道夫受体 A (Macrophage Scavenger Receptor A, SR-A, 亦称为 MSR1) 是此过程的重要参与者<sup>[1,2,3]</sup>, 它对于 mLDL 无限制摄取, 是泡沫细胞形成的关键。此后陆续发现了一些新的清道夫受体, 共同组成了清道夫受体家族<sup>[4]</sup>。SR-A 分为 SR-AI、SR-AII 和 SR-AIII 三型, 由同一基因经选择性剪接产生, 成熟分子以同源三聚体形式存在于细胞膜上。SR-A 结构包括 N-端胞质域、跨膜域、间隔域、 $\alpha$ -螺旋卷曲螺旋域、胶原蛋白样域和 C-端结构域。SR-AI 和 SR-AII 的结构差异在于 SR-AI 的 C-端结构域是清道夫受体半胱氨酸富集域 (Scavenger Receptor Cysteine Rich domain, SRCR), 而 SR-AII 的 C-端则无此结构域。研究表明 SR-AI 和 SR-AII 在介导摄取 mLDL 时无明显差异<sup>[5]</sup>, 均是通过胶原蛋白样域与配

基结合。免疫球蛋白都有高度保守的半胱氨酸富集域 (Cysteine Rich domain), 推测 SR-AI 的 SRCR 结构域可能同机体防御有关<sup>[1]</sup>。SR-AIII 只存在于细胞内质网中, 其 C-端胶原蛋白样域变短, 推测 III 型可能通过与 I 或 II 型肽链形成异源三聚体而起负调控作用<sup>[6]</sup>。与 LDL 受体不同, SR-A 摄取内吞 mLDL 不受胞内胆固醇水平的负反馈调节, 造成胞内脂质无限制积聚, 形成泡沫细胞, 最终出现动脉粥样硬化病灶。实验结果表明, SR-A/apoE 双基因敲除小鼠比 apoE 单基因敲除小鼠的动脉粥样硬化损伤减少了 60%<sup>[2]</sup>, 其它研究工作显示了相似的结果<sup>[7,8]</sup>, 因此 SR-A 被认为是发现新型心血管药物的潜在靶位<sup>[2,3]</sup>, 抑制 SR-A 活性的化合物有望成为治疗动脉粥样硬化的候选药物。本文报道人 SR-AII 胞外结构域 (命名为可溶性人清道夫受体 AII, shSR-AII) 在毕赤酵母中的分泌表达, 为以 SR-AII 为靶点建立心血管药物筛选模型奠定了基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 细胞株、菌株和载体: 人单核细胞株 THP-1

收稿日期: 2004-04-16, 修回日期: 2004-08-26。

基金项目: 国家自然科学基金重点项目和“十五”国家重大专项创新药物与中药现代化资助 (No. 39930190, No. 2002AA2Z343D)。

\* 通讯作者。 Tel: 86-10-63028003; Fax: 86-10-63017302; E-mail: binhong69@hotmail.com

用于提取总 RNA;人单核细胞株 U937 细胞用于建立泡沫细胞模型。*E. coli* TG1 为 pGEM-T 的宿主菌;*P. pastoris* GS115 为毕赤酵母宿主菌,用于诱导表达 shSR-AII。载体 pGEM-T (Promega)为克隆载体,用于克隆 PCR 片段;载体 pPIC9K (Invitrogen)为酵母分泌型表达载体,用于构建表达质粒。

**1.1.2 试剂和引物:** *Pfu* DNA 聚合酶、DNA 片段回收试剂盒购自上海 Sangon 公司,佛波酯(PMA)、LDL 购自 Sigma 公司,限制酶、SV 总 RNA 提取试剂盒、碱性磷酸酶底物 NBT/BCIP 购自 Promega 公司,RT-PCR 试剂盒购自 Invitrogen 公司,山羊抗人 SR-AI/II 多克隆抗体购自 Chemicon 公司,兔抗人 ApoB 多克隆抗体购自 Calbiochem 公司,碱性磷酸酶标记山羊抗兔及兔抗山羊抗体购自北京中山生物技术公司。N-连接去糖基化酶 PNGase F 购自 Biolabs 公司。寡核苷酸引物由北京赛百盛基因技术公司合成。

**1.1.3 培养基:** LB 培养基用于大肠杆菌的培养,YPD,MD,BMGY,BMMY 培养基用于毕赤酵母的培养,均按 Invitrogen 公司实验手册配制。

## 1.2 方法

**1.2.1 shSR-AII cDNA 的 RT-PCR 与克隆:**人 THP-1 细胞用 200 nmol/L 的 PMA 处理 4d<sup>[9]</sup>后,按照 SV 总 RNA 提取试剂盒说明提取总 RNA,验证其完整性。根据 RT-PCR 试剂盒使用说明以总 RNA 为模板、Oligo dT 为引物逆转录合成 cDNA。

根据 SR-AII 的 cDNA<sup>[9]</sup>序列设计引物 P1 (5'-CG GAATTC AACTGGGAAACGAAGAATTGC-3')、P2 (5'-CGGAATTC TCTGGAGGAGTCACAAAAGGAT-3')用于扩增 shSR-AII cDNA,下划线为 *EcoR* I 位点。以反转录的 cDNA 为模板,用 *Pfu* DNA 聚合酶进行 PCR 反应,反应条件为 95℃,5 min;95℃,45 s,55℃,45 s,72℃,3 min 20 s (5 个循环);95℃,45 s,60℃,45 s,72℃,3 min 20 s (30 个循环);72℃,5 min。PCR 产物经 *Taq* DNA 聚合酶加 A 后与 T 载体 pGEM-T 连接并转化大肠杆菌 TG1 感受态细胞,蓝白斑筛选重组子。对重组质粒 pT-shSR-AII 进行 DNA 序列分析。DNA 片段的回收、连接、转化、质粒提取等均按文献[10]进行。

**1.2.2 毕赤酵母重组表达质粒的构建:** *EcoR* I 酶切重组克隆质粒,回收 shSR-AII cDNA 片段。将 shSR-AII cDNA 与经 *EcoR* I 酶切和去磷酸化处理的 pPIC9K DNA 连接并转化大肠杆菌 TG1 感受态细胞,提取重组质粒,用 *EcoR* I、*Sma* I 酶切鉴定重组表达质粒。pPIC9K 和 shSR-AII cDNA 内部各有一个

*Sma* I 酶切位点,shSR-AII 以正确方向插入到 pPIC9K 时,重组表达质粒经 *Sma* I 酶切应产生 4 586 bp、5 669 bp 两片段。对正向插入的重组质粒进一步使用 5'-醇氧化酶 1 基因(5'-AOX1)引物 P3(5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3')进行 DNA 序列分析,验证阅读框的正确与否。

**1.2.3 毕赤酵母的转化、筛选和鉴定:**参照 Invitrogen 公司实验手册用 *Sal* I 线性化质粒 pPIC9K 和重组表达质粒,分别电穿孔法转化毕赤酵母 GS115 (*his4*)感受态细胞。MD 平板筛选出 His<sup>+</sup>转化子后,参照原位双膜法<sup>[11]</sup>筛选上述转化子。在 BMMY 板上置一大小相当的硝酸纤维素膜,并以同样大小的醋酸纤维素膜置于硝酸纤维素膜上,将转化子接种于醋酸纤维素膜上,30℃培养 18 h 后,醋酸纤维素膜 4℃保存。将硝酸纤维素膜用含 30 g/L 脱脂奶粉的 Tris 缓冲液(1×TBS)室温孵育 30 min,山羊抗人 SR-AI/II 的多克隆抗体(1:2200)室温孵育 1 h,碱性磷酸酶标记的兔抗山羊抗体(1:1200)室温孵育 1 h,NBT/BCIP 显色,根据免疫印迹显色筛选重组菌株。挑取免疫印迹显色较深的转化子接种于 YPD 培养基 30℃,250 r/min 液体培养过夜,提取基因组 DNA。以基因组 DNA 为模板,使用 5'-醇氧化酶 1 基因(5'-AOX1)引物 P3 和 3'-醇氧化酶 1 基因(3'-AOX1)引物 P4(5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3')进行 PCR 反应,验证 shSR-AII cDNA 与酵母染色体基因组整合状况。对照菌株 GS115/pPIC9K 应扩增出 2 200 bp 和 429 bp 两条带,而重组菌株 GS115/p9K-shSR-AII 应扩增出 2 200 bp 和 1 408(429 + 979) bp 两条带,均为甲醇利用正常型。

**1.2.4 毕赤酵母的诱导表达:**将重组菌株 GS115/p9K-shSR-AII 和对照菌株 GS115/pPIC9K 分别接种于甘油复合培养基(BMGY)中,250 r/min 30℃振荡培养 16 至 18 h,收集菌体,以  $OD_{600} = 2$  重悬于甲醇复合培养基(BMMY)中进行诱导表达,每隔 24 h 补加甲醇于发酵液中至 1% 终浓度,诱导培养 4d 后离心收集发酵液上清,65%硫酸铵沉淀蛋白,4℃静置 2 h,12 000 r/min 离心 25 min,1×PBS 重溶蛋白沉淀,对 1×PBS 透析 24 h,冻干得到发酵粗品备用。

**1.2.5 SDS-PAGE 和 Western blot 分析** 发酵上清液经 SDS-PAGE 后,考马斯亮蓝染色。同时另外一块胶用于 Western blot 分析,电转移蛋白至硝酸纤维素膜上,用含 30 g/L 脱脂奶粉的 1×TBS 室温孵育 30 min,山羊抗人 SR-AI/II 的多克隆抗体(1:2200)室温孵育 1 h,碱性磷酸酶标记的兔抗山羊抗体(1:1200)

室温孵育 1 h, NBT/BCIP 显色。

**1.2.6 去糖基化反应:** 发酵上清液在终浓度分别为 0.5% SDS 和 1%  $\beta$ -巯基乙醇存在的条件下沸水浴 10 min, 冷却后加 1/10 体积的 0.5 mol/L pH 7.5 的 1  $\times$  PBS、10% NP-40 及 500 u 的 PNGase F, 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h。

**1.2.7 oxLDL 的制备<sup>[12]</sup>:** 将 LDL (1 mg/mL) 置于含 10  $\mu$ mol/L  $\text{CuSO}_4$  的 PBS 中, 37 $^{\circ}$ C 透析 12 h 后, 在含 0.1% EDTA 的 1  $\times$  PBS 中透析 24 h, 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌备用。 $\text{CuSO}_4$  氧化生成的丙二醛基(存在于 oxLDL 中)可与硫代巴比妥酸结合生成红色产物, 通过此法测得 LDL 的修饰程度。测得 LDL 中每毫克胆固醇中丙二醛含量为 10.3 nmol, 氧化后每毫克胆固醇中丙二醛含量为 35.9 nmol。

**1.2.8 Ligand binding blot 分析:** 参照文献[13]方法对发酵上清液进行非还原(未经巯基乙醇和煮沸处理)SDS-PAGE, 电转移蛋白至硝酸纤维素膜上进行 Ligand binding blot 分析。用含 30 g/L 脱脂奶粉的 1  $\times$  TBS 室温孵育硝酸纤维素膜 30 min。以 oxLDL (终浓度 1.6 mg/L) 室温孵育 2 h, 兔抗人 ApoB 的多克隆抗体(1:1000)室温孵育 2 h, 碱性磷酸酶标记的山羊抗兔抗体(1:1500)室温孵育 1 h, NBT/BCIP 显色。

**1.2.9 泡沫细胞形成的抑制:** 参照李全忠等<sup>[12]</sup>方法利用人单核细胞株 U937 细胞建立泡沫细胞模型, 用于分析 shSR-AII 的配基结合活性。在 96 孔板中 100 nmol/L PMA 孵育 U937 细胞 72 h 后, 不加 oxLDL 的细胞为空白组; 加 oxLDL (80 mg/L) 的细胞为对照组 I; 加 oxLDL (80 mg/L) 和 GS115/pPIC9K 发酵粗品(3 mg/mL 1  $\times$  PBS 各 1, 5, 10  $\mu$ L) 的细胞为对照组 II, 加 oxLDL (80 mg/L) 和 GS115/p9K-shSR-AII 发酵粗品(3 mg/mL 1  $\times$  PBS 各 1, 5, 10  $\mu$ L) 的细胞为实验组, 每个浓度设 3 个重复孔, 继续培养 48 h。固定细胞, 经油红 O 染色后镜检观察细胞。

## 2 结果

### 2.1 shSR-AII cDNA 片段的获得

以 PMA 诱导的 THP-1 细胞总 RNA 为模板进行 RT-PCR 反应, 扩增得到 shSR-AII 的 cDNA 序列。PCR 产物电泳结果如图 1 所示, 可见预期大小片段(979 bp)的 DNA 条带。将 PCR 产物克隆至 pGEM-T, 重组质粒命名为 pT-shSR-AII, 经 *EcoR* I 酶切可见与 PCR 产物大小相同的 DNA 条带(图 1)。重组质粒 pT-shSR-AII 中克隆的 PCR 片段测序结果与文献[9]报道的人 SR-AII 胞外部分 cDNA 序列一致。

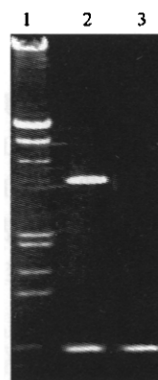


图 1 shSR-AII cDNA RT-PCR 产物电泳分析

Fig. 1 Electrophoretic analysis of RT-PCR product of shSR-AII cDNA

1:  $\lambda$  DNA/*Hind* III + *EcoR* I marker (21, 226 bp, 5, 148 bp, 4, 973 bp, 4, 268 bp, 3, 530 bp, 2, 027 bp, 1, 904 bp, 1, 584 bp, 1, 375 bp, 947 bp, 831 bp, 564 bp, 125 bp); 2: pT-shSR-AII/*EcoR* I; 3: RT-PCR product (979 bp)

### 2.2 毕赤酵母重组表达质粒的构建与鉴定

将 shSR-AII cDNA 克隆到毕赤酵母表达载体 pPIC9K 中, 获得重组表达质粒 p9K-shSR-AII (图 2)。酶切鉴定结果见图 3, 用 *EcoR* I 酶切 p9K-shSR-AII 得到 shSR-AII cDNA 片段(979 bp)。*Sma* I 酶切 p9K-shSR-AII 得到 4 586 bp、5 669 bp 两片段(见 1.2.2), 表明 shSR-AII cDNA 片段正向克隆至 pPIC9K 中  $\alpha$ -因子信号肽下游。DNA 序列分析显示 shSR-AII cDNA 正确融合于 pPIC9K  $\alpha$ -因子信号肽阅读框下游。

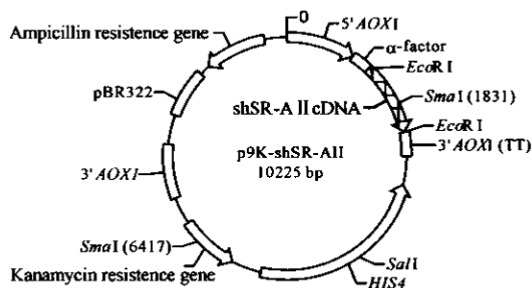


图 2 重组表达质粒 p9K-shSR-AII 示意图

Fig. 2 The sketch map of recombinant expression plasmid p9K-shSR-AII

### 2.3 毕赤酵母重组子的筛选与鉴定

*Sal* I 线性化重组质粒 p9K-shSR-AII, 电穿孔转化 *P. pastoris* GS115。采用原位双膜法<sup>[11]</sup>根据免疫显色的强弱鉴定毕赤酵母重组子表达水平的高低, 可见不同菌落的显色强度有明显差异。选择显色较深的重组子, 提取其基因组 DNA, 用引物 P3、P4 进行 PCR 反应验证异源基因在染色体上的整合情况。PCR 结果如图 4, 表明目的基因已整合至重组子基

因组,其表型为甲醇利用正常型(见 1.2.3)。重组菌株命名为 GS115/p9K-shSR-AII。

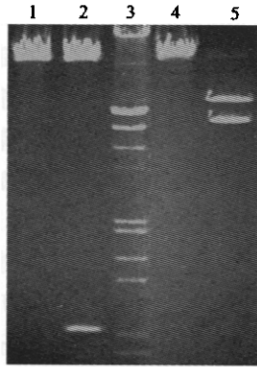


图 3 p9K-shSR-AII 的酶切鉴定分析

Fig. 3 Restriction analysis of p9K-shSR-AII

1: pPIC9K/*EcoRI* (9 276 bp); 2: p9K-SR-AII/*EcoRI* (9 276 bp, 979 bp); 3: λ DNA/*HindIII* + *EcoRI* marker (21 226 bp, 5 148 bp, 4 973 bp, 4 268 bp, 3 530 bp, 2 027 bp, 1 904 bp, 1 584 bp, 1 375 bp, 947 bp, 831 bp, 564 bp, 125 bp); 4: pPIC9K/*SmaI* (9276 bp); 5: p9K-shSR-AII/*SmaI* (5 669 bp, 4 586 bp)

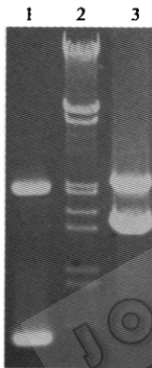


图 4 PCR 法分析鉴定毕赤酵母重组子

Fig. 4 Identification of the recombinant *P. pastoris* strains by PCR

1: GS115/pPIC9K genome DNA as PCR template (2,200 bp, 429 bp); 2: λ DNA/*HindIII* + *EcoRI* marker (21 226 bp, 5 148 bp, 4 973 bp, 4 268 bp, 3 530 bp, 2 027 bp, 1 904 bp, 1 584 bp, 1 375 bp, 947 bp, 831 bp, 564 bp, 125 bp); 3: GS115/p9K-shSR-AII genome DNA as PCR template (2 200 bp, 1 408 bp)

## 2.4 shSR-AII 在毕赤酵母中的诱导表达

GS115/p9K-shSR-AII 经 1% 甲醇诱导表达,发酵液上清进行 SDS-PAGE 分析,约 60 kD 处有一明显的蛋白质条带出现(图 5 A)。对其进行 Western blot 印迹分析,在与该条带相对应位置处出现一杂交带(图 5 B, Lane 2),表明重组菌株可分泌表达 shSR-AII,检测其表达量约为 2 g/L 培养液。表达产物用 N-连接去糖基化酶 PNGase F 进行去糖基处理后,去糖基化产物约 35 kD(图 5 B, Lane 3)。

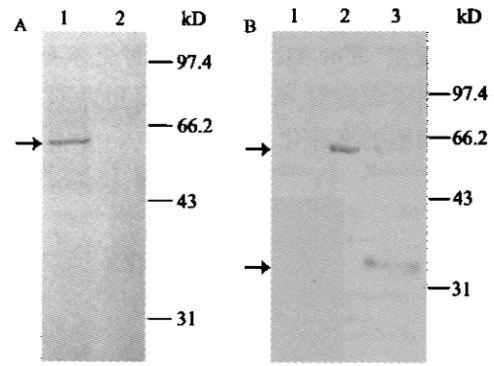


图 5 shSR-AII 的 SDS-PAGE、Western blot 及去糖基化分析

Fig. 5 SDS-PAGE and Western blot analysis of recombinant shSR-AII and deglycosylated shSR-AII

A: SDS-PAGE. 1: culture supernatant of GS115/p9K-shSR-AII; 2: culture supernatant of GS115/pPIC9K.

B: Western blot. 1: culture supernatant of GS115/pPIC9K; 2: culture supernatant of GS115/p9K-shSR-AII; 3: deglycosylated shSR-AII

## 2.5 重组 shSR-AII 配基结合活性分析

重组菌株 GS115/p9K-shSR-AII 和对照菌株 GS115/pPIC9K 的发酵液上清在非还原条件下进行 SDS-PAGE,蛋白转移至硝酸纤维素膜,与 oxLDL 孵育后,用 ApoB (LDL 中主要蛋白质成分)的抗体检测 oxLDL 与 shSR-AII 的结合,进行 Ligand binding blot 分析,结果如图 6 所示。重组 shSR-AII 样品在远大于 100 kD 分子量处出现一与 oxLDL 结合的条带(图 6, Lane 1),表明分泌表达的 shSR-AII 可能以多聚体形式存在,并具有结合其配基 oxLDL 的活性。将重组 shSR-AII 样品用巯基乙醇和煮沸处理后在相当于 80 kD 处出现一新的结合条带(图 6, Lane 2),推测其为 shSR-AII 单体形式,进一步说明分泌表达的 shSR-AII 是以多聚体形式存在。

## 2.6 重组 shSR-AII 对 U937 细胞泡沫化的影响

U937 细胞经 PMA 处理后分化为巨噬细胞,形状变得不规则,细胞表面有清道夫受体的表达<sup>[14]</sup>。与 oxLDL 孵育后,巨噬细胞无限制摄取 oxLDL 而泡沫化,经油红 O 染色后细胞内有红色油滴状颗粒出现。实验结果表明,空白组细胞未与 oxLDL 孵育,细胞内不出现红色油滴状颗粒。对照组 I 细胞与 oxLDL 孵育后细胞内有红色油滴状颗粒出现,表明细胞发生了泡沫化。重组菌株 GS115/p9K-shSR-AII 的发酵粗品(实验组)对泡沫细胞形成有显著影响,随着 GS115/p9K-shSR-AII 发酵粗品量的增加,shSR-AII 可明显抑制 U937 细胞的泡沫化,而同样浓度的对照菌株 GS115/pPIC9K 的发酵粗品(对照组 II)对

U937 细胞的泡沫化无影响。以上结果表明毕赤酵母表达的重组 shSR-AII 与细胞表面受体竞争结合 oxLDL, 抑制了细胞对 oxLDL 的结合和摄取, 从而抑制了巨噬细胞的泡沫化。

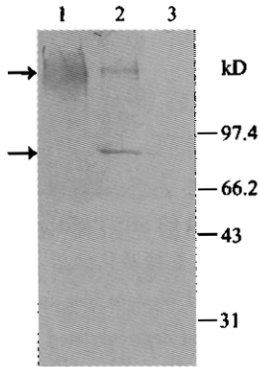


图 6 shSR-AII 的 Ligand Binding blot 分析结果

Fig. 6 Ligand binding blot analysis of shSR-AII

1: culture supernatant of GS115/p9K-shSR-AII (non-reduced); 2: culture supernatant of GS115/p9K-shSR-AII (reduced, the sample was treated with mercaptoethanol and boiled before loading); 3: culture supernatant of GS115/pPIC9K (non-reduced). The protein marker was non-reduced

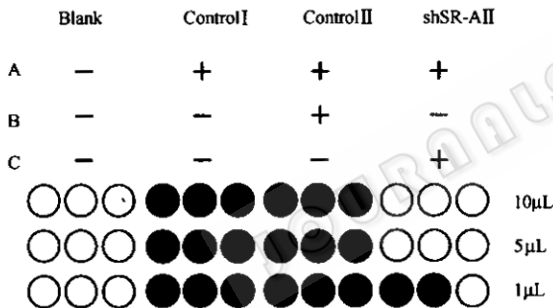


图 7 重组 shSR-AII 对 U937 泡沫化程度的影响

Fig. 7 The effect of shSR-AII on formation of foam cells of U937 cells

The formation of foam cells was indicated by shaded circle.

A: oxLDL; B: GS115/pPIC9K; C: GS115/p9K-shSR-AII

### 3 讨论

真核微生物毕赤酵母 *P. pastoris* 在表达真核异源蛋白时具有许多优良的特点, 它不仅具有原核表达系统高效、快速、简便的特点, 同时又能进行与哺乳动物细胞类似的翻译后加工。它可通过载体将外源基因整合到酵母细胞染色体中形成整合型表达工程菌株, 其优点是稳定性好, 并可形成外源基因的多拷贝整合, 且不会因为糖基化价键的问题而引起抗原抗体反应<sup>[15]</sup>。另外 *P. pastoris* 自身的分泌蛋白质较少且易于高密度发酵, 因此当使用分泌表达方

式时, 在表达、分离和纯化蛋白质等方面具有很强的优势。目前已有多种真核蛋白质在 *P. pastoris* 成功表达<sup>[16]</sup>。本文首次报道利用毕赤酵母分泌表达具有配基结合活性的 shSR-AII, 并能抑制 U937 的泡沫化, 为以 shSR-AII 为靶点建立适于高通量筛选的清道夫受体拮抗剂药物筛选模型的研究奠定了基础。

人 SR-A 包括 SR-AI、SR-AII 是以同源三聚体形式存在于细胞表面, 文献报道 CHO 细胞表达的人 SR-AII 单体分子量接近 69 kD<sup>[6]</sup>, 含 7 个潜在 N-连接糖基化位点。从人 SR-AII cDNA 推断 shSR-AII 单体由 282 个氨基酸组成, 包括全部 7 个潜在的糖基化位点, 非糖基化蛋白分子的计算分子量约为 31 kD。我们在毕赤酵母中表达的人 SR-AII cDNA 的胞外部分 shSR-AII 分子量约为 60 kD, 由于该受体分子不包括 SR-AII N-胞内区、跨膜区约 10 kD 肽段, 因此推断其糖基化程度同在 CHO 细胞中表达的 SR-AII 比较接近。PNGase F 主要作用于 N-连接的糖苷键, shSR-AII 使用 PNGase F 处理后得到一个约 35 kD 的产物, 可能暗示在毕赤酵母表达的 shSR-AII 含有其它类型的糖苷键, 如 O-连接糖苷键。现在关于 *P. pastoris* 中 O-糖基化的机制和特异性的信息了解还不多, 但已有在 *P. pastoris* 中表达的外源蛋白产物存在 O-糖基化的报道, 如人 IGF-1<sup>[17]</sup>。另外此分子量差异也可能是由 PNGase F 处理后在每个糖基化位点处残留的 N-乙酰胺糖基造成的<sup>[18]</sup>。Ligand binding blot 显示本工作表达的 shSR-AII 以多聚体形式存在, 并具有显著的配基结合能力, 表明毕赤酵母具有较强的翻译后修饰能力, 表达的异源蛋白可形成由二硫键稳定的多聚体形式。进一步的研究表明, 重组 shSR-AII 的聚体形式与重组菌株的发酵条件有关 (另文发表)。

目前可溶性受体的研究已受到广泛关注。天然存在的可溶性受体, 如白介素受体, 通过不同的途径产生<sup>[19]</sup>。天然状态不存在可溶性形式的膜受体可通过异源表达而得到其可溶性形式。目前许多可溶性受体在不同表达系统中获得了成功表达。鉴于可溶性受体具有和配基结合的能力, 因此其一方面天然受体拮抗剂, 另一方面可作为靶点建立筛选模型从而发现相应受体的激动剂或拮抗剂, 为发现新型作用机制药物提供了独特的思路, 这方面的研究目前已有许多报道<sup>[19]</sup>。最近有文献报道清道夫受体家族部分成员, 如 S4D-SRCRB<sup>[20]</sup> 和 SREC<sup>[21]</sup> 也存在天然可溶性形式, 可能是通过 mRNA 选择性剪接产生。到目前为止未见天然存在可溶性 SR-A 的报

道。Laukkanen 等<sup>[3]</sup>以腺病毒为载体在 RAW264 和 ECV304 细胞中表达人 SR-AI 胞外部分(即可溶性形式),可有效阻止正常小鼠巨噬细胞对 mLDL 的摄取和降解,抑制泡沫细胞的形成,说明可溶性人 SR-A 具有配基结合能力。SR-AII 和 SR-AI 的结构差异在于 SR-AII C-端缺少一个与机体防御有关的 SRCR 结构域,而 SR-AII 和 SR-AI 在摄取 mLDL 时无明显差异<sup>[5]</sup>,且 SR-AII 分子相对较小,更适于作为抗巨噬细胞泡沫化药物筛选的靶点。Ligand binding blot 和 U937 细胞泡沫化抑制实验均表明分泌表达的重组 shSR-AII 具有配基结合活性,可用于构建分子水平的药物筛选模型,来寻找巨噬细胞泡沫化的抑制剂。利用重组 shSR-AII 构建新型高通量药物筛选模型的工作正在进行之中。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Krieger M, Herz J. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem*, 1994, **63**: 601 - 637
- [2] Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M *et al.* A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*, 1997, **386**: 292 - 296
- [3] Laukkanen J, Lehtolainen P, Gough PJ *et al.* Adenovirus-mediated gene transfer of a secreted form of human macrophage scavenger receptor inhibits modified low-density lipoprotein degradation and foam-cell formation in macrophages. *Circulation*, 2000, **101**: 1091 - 1096
- [4] Liu M (刘明), Hong B (洪斌), Si SY (司书毅). A Therapeutic Target for Atherosclerosis: Scavenger Receptor A. *Chin Biotech* (中国生物工程杂志), 2003, **23** (16): 1 - 6
- [5] Lysko P G, Weinstock J, Webb C L *et al.* Identification of a small-molecule, nonpeptide macrophage scavenger receptor antagonist. *JPET*, 1999, **289** (3): 1277 - 1285
- [6] Gough P J, Greaves D R, Gordon S. A naturally occurring isoform of the human macrophage scavenger receptor (SR-A) gene generated by alternative splicing blocks modified LDL uptake. *J Lipid Res*, 1998, **39**: 531 - 543
- [7] Sakaguchi H, Takeya M, Suzuki H *et al.* Role of macrophage scavenger receptors in diet-induced atherosclerosis in mice. *Lab Invest*, 1998, **78**: 423 - 434
- [8] de Winther MP, Gijbels MJ, van Dijk KW *et al.* Scavenger receptor deficiency leads to more complex atherosclerotic lesions in APOE3Leiden transgenic mice. *Atherosclerosis*, 1999, **144**: 315 - 321
- [9] Matsumoto A, Naito M, Itakura H *et al.* Human macrophage scavenger receptors: Primary structure, expression, and localization in atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 9133 - 9137
- [10] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [11] McGrew JT, Leiske D, Dell B *et al.* Expression of trimeric CD40 ligand in *Pichia pastoris*: use of a rapid method to detect high-level expression transformants. *Gene*, 1997, **187** (2): 193 - 200
- [12] Li QZ (李全忠), Yang YZ (杨永宗), Yi GH (易光辉) *et al.* Establishment of a novel foam cell model from human monocytic U937 cell line. *Chin J Arterioscler* (中国动脉硬化杂志), 1999, **7** (2): 152 - 154
- [13] Bochkov VN, Tkachuk VA, Philippova MP *et al.* Ligand selectivity of 105 kD and 130 kD lipoprotein-binding proteins in vascular-smooth-muscle-cell membranes is unique. *Biochem J*, 1996, **317**: 297 - 304
- [14] Jin Y (金艳), Chen Q (陈琪), Wei EH (魏恩会) *et al.* Inhibition of scavenger receptor expression treated with PMA by the inhibitor of tyrosine protein kinase genistein. *Acta Biochimica et Biophysica sinica* (生物化学与生物物理学报), 2001, **33** (1): 142 - 146
- [15] Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, 1992, **8** (6): 423 - 488
- [16] Gregg JM, Cereghino JL, Shi JY *et al.* Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol*, 2000, **16**: 23 - 52
- [17] Brierley R A. Secretion of recombinant human insulin-like growth factor I (IGF-I). *Methods Mol Biol*, 1998, **103**: 149 - 177
- [18] Tschopp JF, Sverlow G, Kosson R *et al.* High-level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Biol Technology*, 1987, **5**: 1305 - 1308
- [19] Li Y (李元), Chen SS (陈松森), Wang WC (王渭池) *et al.* Genetically Engineered Pharmaceuticals (基因工程药物). Beijing: Chemical Industry Press, 2002
- [20] Padilla O, Pujana M A, Lopez-de la Iglesia A *et al.* Cloning of S4D - SRCRB, a new soluble member of the group B scavenger receptor cysteine-rich family (SRCR-SF) mapping to human chromosome 7q11.23. *Immunogenetics*, 2002, **54** (9): 621 - 634
- [21] Adachi H, Tsujimoto M. Characterization of the human gene encoding the scavenger receptor expressed by endothelial cell and its regulation by a novel transcription factor, endothelial zinc finger protein-2. *J Biol Chem*, 2002, **277** (27): 24014 - 24021

## Secretory Expression of Extracellular Domains of Human Scavenger Receptor Class A Type II in *Pichia pastoris*

LIU Ming HONG Bin\* WU Ye-Xiang WANG Li-Fei SI Shu-Yi LI Yuan

(Institute of Medicinal Biotechnology, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

**Abstract** Scavenger receptor class A (SR-A) plays an important role in atherosclerosis by mediating unlimited influx of modified low density lipoprotein (mLDL) into the macrophages and eventually leads to the formation of lipid-filled foam cells and atherosclerosis plaque. SR-A may be a potential therapeutic target for atherosclerosis, and the antagonists of this receptor may prevent the initiation of atherosclerosis. This work mainly described the secretory expression of extracellular domains of human SR-A in *Pichia pastoris* GS115. Total RNA was extracted from human monocytic leukemia THP-1 cells treated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Using RT-PCR the coding sequence of extracellular domains of the human SR-AII designated soluble hSR-AII (shSR-AII) was obtained, which was cloned in *P. pastoris* expression vector pPIC9K. The recombinant expression plasmid was designated as p9K-shSR-AII. The cDNA fragment was fused in the same open reading frame of the  $\alpha$ -factor signal sequence. Then the recombinant plasmid was linearized and transformed into *P. pastoris* strain GS115 by electroporating technique. Positive transformants were grown on histidine-deficient medium and the transformants with high-level expression of shSR-AII were further selected employing *in situ* double-film method. PCR analysis of the recombinants was performed to verify the existence of the interest gene in the recombinant *Pichia* genome. The transformants confirmed above were grown in BMGY medium and then induced to express shSR-AII in BMMY medium, and the latter supernatant was analyzed using SDS-PAGE. The expression product of positive strains was further examined by Western blot. The results indicated the recombinant shSR-AII was about 60 kD and glycosylated. The ligand binding activity of recombinant shSR-AII *in vitro* was demonstrated using ligand binding blot. In addition, the recombinant shSR-AII inhibited the formation of foam cell derived from U937 cells treated with PMA. To the best of our knowledge, it is the first report of overexpression of shSR-AII in *P. pastoris*. This work built a solid foundation for construction of the drug-screening model to find potential antagonists of SR-A.

**Key words** shSR-AII, *P. pastoris*, Atherosclerosis

Received: 04-16-2004

This work was supported by Grant from Key Project of National Natural Science Foundation of China (No. 39930190) and 10<sup>th</sup> Five-Year-Plan Special Programs for New Drug and Modernization of Chinese Medicine (No. 2002AA2Z343D).

\* Corresponding author. Tel: 86-10-63028003; Fax: 86-10-63017302; E-mail: binhong69@hotmail.com