

A 类清道夫受体 N 端第 1~27 位氨基酸胞浆结构域缺失对功能的影响

陈耀宇, 管晓翔, 王晓花, 乐 珅, 柏 惠, 陈秀英, 季 勇, 范乐明, 陈 琪

(南京医科大学动脉粥样硬化研究中心, 江苏省功能基因组学重点实验室, 江苏省南京市 210029)

[关键词] 病理学与病理生理学; A 类清道夫受体; 胞浆域; 摄取; 粘附

[摘要] 目的 确定 A 类清道夫受体胞浆域中的信号序列, 探讨其对于受体功能的影响。方法 构建 A 类清道夫受体 N 端第 1~27 位氨基酸胞浆结构域缺失体的表达质粒, 并将其经脂质体介导瞬时转染入 CHO 细胞中。用 Western blot 检测 A 类清道夫受体在细胞中的表达, 并用流式细胞仪定量检测转染后的蛋白表达效率。用 DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白与转染的细胞共孵育, 激光共聚焦显微镜下观察乙酰化低密度脂蛋白在细胞内的分布, 并进行荧光定量分析。结果 A 类清道夫受体 N 端第 1~27 位氨基酸胞浆结构域缺失体可大量表达于转染细胞膜和细胞浆。在高浓度乙酰化低密度脂蛋白刺激下, A 类清道夫受体 N 端第 1~27 位氨基酸胞浆结构域缺失体的细胞内定位发生变化, 也可存在于转染细胞核内。A 类清道夫受体 N 端第 1~27 位氨基酸胞浆结构域缺失体摄取 DiI 标记乙酰化低密度脂蛋白的能力较全长相比下降约 60%, 细胞粘附能力较全长 A 类清道夫受体相比则下降约 8.9%。结论 A 类清道夫受体的 N 端第 1~27 位氨基酸结构对于 A 类清道夫受体在细胞内的定位表达、结合和摄取配体以及调节细胞粘附的功能具有重要的作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Truncation 1 to 27 Amino Acid Residues of the N-Terminal Cytoplasmic Domain Mediate the Function of Scavenger Receptor A

CHEN Yao-Yu, GUAN Xiao-Xiang, WANG Xiao-Hua, YUE Shen, BAI Hui, CHEN Xiur-Ying, JI Yong, FAN Le-Ming, and CHEN Qi

(Atherosclerosis Research Center, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

[KEY WORDS] Pathophysiology; Scavenger Receptor A; Expression; Internalization; Cell Adhesion

[ABSTRACT] Aim To elucidate the role of the motifs in the cytoplasmic domain of scavenger receptor A (SR-A).

Methods A SR-A DNA mutant (SR-A Δ_{1-27}) was constructed by truncating the 1 to 27 amino acid residues of the N-terminal cytoplasmic domain. SR-A and SR-A Δ_{1-27} were transfected into CHO cells by Lipofectamine 2000. Western blot, laser confocal microscopy, flow cytometry and cell adhesion assay were used additionally. Results Compared with SR-A, expression of the SR-A Δ_{1-27} was increased and amount of cell associated DiI-labeled ac-LDL in SR-A Δ_{1-27} expressing cells were almost reduced 80%.

SR-A Δ_{1-27} was able to assemble in the plasma membrane and cytoplasm. SR-A Δ_{1-27} could bind its lipoprotein ligands but decline to internalize the bound ligands greatly. Incited by ac-LDL, SR-A Δ_{1-27} located not only in membrane and plasma, but also in the nuclear. The SR-A Δ_{1-27} display decreased adhesion.

Conclusion The 1 to 27 amino acid residues of the N-terminal cytoplasmic domain mediate SR-A expression and location, lipid uptake and cell adhesion

清道夫受体 (scavenger receptor, SR) 是一类主要位于巨噬细胞表面的糖蛋白, 至少存在 5 种不同类型即 SR-A、CD36、SR-C、CD68 和 LOX-1^[1]。SR-A 又有三个亚型, 各成员之间结构相似, 由 5 或 6 个结构域组成, 均是同源三聚体跨膜糖蛋白^[2]。SR-A 能

与氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 结合, 并介导其内移, 使巨噬细胞转变成泡沫细胞, 因而与动脉粥样硬化 (As) 的关系极为密切^[3], 被认为是潜在的治疗 As 的靶标^[4]。本实验室证明, 截除 SR-A 全部胞浆域后, 受体内移的功能明显受到抑制^[5]。本研究则在此基础上, 进一步探索去除 SR-A 第 1-27 位氨基酸胞浆域后, SR-A 功能可能产生的变化。

[收稿日期] 2005-01-04

[修回日期] 2005-04-23

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划项目 (TG200056910); 国家自然科学基金资助项目 (30370576)

[作者简介] 陈耀宇, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的分子机制。王晓花, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的分子机制。通讯作者陈琪, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事脂代谢及动脉粥样硬化性疾病分子机制研究, 联系电话 025-86862610, E-mail: qichen@njmu.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM/F12 为美国 GibcoBRL 公司产品, 小牛血

清为杭州四季青公司产品, 荧光染料 DiI 为美国 Molecular Probe 公司产品, 限制性内切酶为 Takara 公司产品, DNA 回收试剂盒为 Millipore 公司产品, T4 DNA 连接试剂盒为 New England Bio 公司产品, 脂质体 (Lipofectamine 2000) 为 Invitrogen 公司产品, 抗清道夫受体抗体 (AHP563) 为 Serotec 公司产品, HRP-兔抗羊抗体为博士德公司产品, 化学发光试剂盒 (ECL) 为 Amersham Biosciences 公司产品, PCR 引物为上海博亚公司合成。

1.2 低密度脂蛋白的制备、修饰、标记和鉴定

常规分离健康人空腹血清, 序列超速离心分离 LDL ($d = 1.019 \sim 1.063$), 所得 LDL 经 PBS (10 mmol/L, pH 7.4) 透析、滤菌后, 用 BCA 法测定蛋白质浓度, 4℃保存。LDL 的 DiI 标记及乙酰化参考文献 [6, 7], 标记率为 50 $\mu\text{g/g}$, 乙酰化修饰后相对于天然 LDL 琼脂糖凝胶电泳迁移率为 2.4。无脂血清 (LPDS) 由超离所分得, $d > 1.21$, 透析后恢复至原体积, 滤菌备用。

1.3 A 类清道夫受体第 1~27 位氨基酸胞浆域缺失体的构建

以人 A 类 $\text{CD}36$ 型清道夫受体 (SR-A $\text{CD}36$) 的全长 cDNA 为模板, 用 PCR 方法获得 N 端第 1~27 位氨基酸胞浆域缺失体 (SR-A $\Delta 1-27$) 序列。引物序列分别为: 5'-CCG GGA TCC TAT CCT GTC TTT GCA TGC TTC CA-3', 5'-CGG CTC GAG GTG ACA GCT TTG ACT CCT CCC CAT CG-3'。PCR 扩增产物及 EGFP-C 质粒经限制性内切酶 BamHI 和 XhoI 37℃酶切 2 h 后, 回收 DNA, 4℃连接过夜, 再用 0.1 mol/L CaCl_2 转化感受态大肠杆菌 DH5 α 后, 均匀涂布于含有卡那霉素的 LB 平板, 筛选阳性克隆, 扩增 DNA 后基因测序。测序结果表明构建的 SR-A $\Delta 1-27$ 核苷酸序列正确, 定位于绿色荧光蛋白的 C 末端。

1.4 细胞培养及瞬时转染及受体功能的检测

CHO 细胞用含有 10% 小牛血清 (FCS) 的 DMEM/F12 培养基, 在 37℃、5% CO_2 的细胞培养箱中培养。转染前 24 h, 细胞经 0.125% 胰酶消化后, 按 5×10^5 个细胞/孔接种 6 孔板培养。将 5 μg 质粒 DNA 和 10 μL 脂质体分别加入 100 μL 无 FCS 的 DMEM/F12 培养基中, 轻轻混匀, 室温静置 20 min 后摇匀, 滴加至 6 孔板中。培养 4~6 h 后, 更换新鲜培养基, 24 h 后用于实验。转染细胞与 5 g/L 的 DiI-A β -LDL 37℃孵育 2 h 后, 鉴定其功能。

1.5 细胞裂解和细胞蛋白的提取

转染 CHO 细胞用 0.125% 胰酶消化, 离心收集, PBS 洗 3 次, 每孔加 200 μL 细胞裂解液 (50 mmol/L

TrisCl pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.1% SDS, 1% NP40, 1 mg/L aprotinin, 0.5% 去氧胆酸钠, 在使用前数分钟内加入 PMSF 至最终浓度为 100 mg/L), 混匀后冰上静置 30 min, 12 kr/min 离心 2 min, 收集上清, BCA 法测定蛋白质浓度后, 分装保存在 -80℃。

1.6 蛋白质免疫印迹检测

以 20 μg 总蛋白/泳道上样, 经 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白质, 电转膜至 PVDF 膜, 加封闭液 (含 5% 脱脂牛奶) 室温孵育 2 h 后, 再加 1:1 500 羊抗清道夫受体抗体, 4℃孵育过夜。PBS-T 洗涤 3 次, 每次 15 min。加 1:2 000 HRP 标记兔抗羊 IgG, 室温孵育 2 h, PBS-T 洗涤 3 次, 每次 15 min。最后加入 ECL, 压片 10 min, 显影, 定影, 成片。

1.7 流式细胞仪定量分析

转染细胞用 0.125% 胰酶消化, 离心收集, 并经 PBS 洗 3 次后, 重悬于 300 μL PBS 中, 用流式细胞仪 (FACS) 获取 20 000 个转染细胞, 测定绿色荧光值, 作为 SR-A $\Delta 1-27$ 表达的观察指标。测定红色荧光值, 作为 SR-A $\Delta 1-27$ 摄取配体的功能指标。将红色荧光与绿色荧光的比值, 作为单位 SR-A 结合和摄取的 A β -LDL。

1.8 受体配体复合物的内移及胞内分布

转染细胞用 5 mg/L 的 DiI-A β -LDL 37℃孵育 2 h 后, PBS 洗 3 次, 在激光共聚焦显微镜下, 观察受体在细胞内的表达和 DiI-A β -LDL 的分布。用 DAPI 染核后, 在荧光显微镜下观察 SR-A $\Delta 1-27$ 在细胞核内的分布。

1.9 受体粘附功能的测定

细胞转染 24 h 后, 以 5×10^5 细胞/孔种于六孔板中, 孵育 24 h, 用 EDTA 溶液 (0.2 kg/L) 在 37℃下孵育细胞 10 min, 以减少阳离子依赖性粘附, PBS 冲洗 3 次, 将仍然粘附在板上的细胞进行细胞计数。细胞的粘附功能用粘附细胞数与种板细胞数的比值来表示。

2 结果

2.1 A 类清道夫受体 N 端第 1~27 位氨基酸胞浆结构域缺失体在 CHO 细胞中的表达

A 类清道夫受体 (SR-A) $\Delta 1-27$ /EGFP 表达质粒转染入 CHO 细胞后 24 h, 在激光共聚焦显微镜下观察到细胞有大量受体蛋白表达。在 EGFP 单独转染的细胞中, 可见绿色荧光蛋白在细胞内呈现弥漫性分布, 细胞浆和细胞核内均可见绿色荧光蛋白。而在 SR-A 和 SR-A $\Delta 1-27$ 转染细胞中, 绿色荧光只存在于细胞浆和细胞膜上, 细胞核内未见绿色荧光 (图 1, Fig-

ure 1)。用流式细胞仪(FACS)测定 SR-A Δ 1-27 的细胞表达平均水平,发现其高于 SR-A,达到125.57%(表1,Table 1)。Western blot 表明 SR-A 和 SR-A Δ 1-27 均在相应的转染细胞中表达,而 EGFP 转染的细胞则未见有清道夫受体蛋白的表达(图 2, Figure 2)。

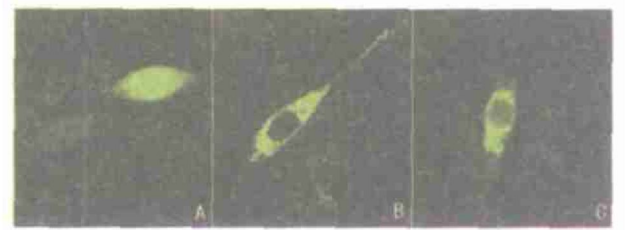


图 1. CHO 细胞转染后 24 h 在激光共聚焦显微镜下观察结果 A 为 EGFP, B 为 SR-A, C 为 SR-A Δ 1-27。

Figure 1. The CHO cells expressing SR-A Δ 1-27 were visualized under laser confocal microscopy

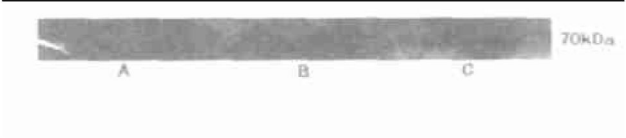


图 2. Western blot 检测受体蛋白的表达 A 为 EGFP, B 为 SR-A, C 为 SR-A Δ 1-27。

Figure 2. SR-A Δ 1-27 was detected by Western blotting

2.2 乙酰化低密度脂蛋白刺激后的 CHO 细胞内定位变化

转染细胞与 5 mg/L 的 Ac-LDL 37℃ 孵育 2 h, DAPI 染核后,在荧光显微镜下可见 SR-A Δ 1-27 在细胞膜、细胞浆和细胞核内均有存在(图 3, Figure 3)。用激光共聚焦显微镜进行 1 μ m 层切扫描,SR-A Δ 1-27 在每一层中均见均匀分布(结果未显示)。

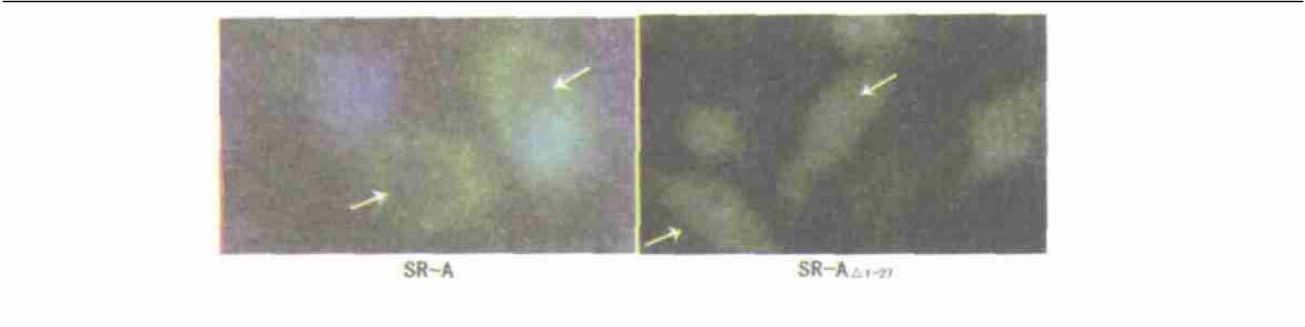


图 3. 乙酰化低密度脂蛋白刺激后清道夫受体 N 端第 1~27 位氨基酸胞浆结构域缺失体在 CHO 细胞内定位变化 荧光显微镜观察受体在细胞核内的分布(蓝色为 DAPI 染色的细胞核,绿色为 SR-A 在细胞内的表达,箭头所指为细胞核所在)

Figure 3. Effect of Ac-LDL on the location of SR-A Δ 1-27 in CHO cells

2.3 转染细胞摄取 DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白的功能

用激光共聚焦显微镜观察 SR-A Δ 1-27 阳性表达细胞与 DiF-Ac-LDL 的作用,发现仅有少量的 DiF-Ac-LDL 结合在细胞表面或进入细胞内,而 EGFP 则未见红色荧光出现于细胞内(图 4, Figure 4)。用 FACS 获取 20 000 个转染 CHO 细胞,定量测定红色荧光值,发现 SR-A Δ 1-27 结合和摄取 DiF-Ac-LDL 的能力约为全长 SR-A 的 39.04%。考虑到受体表达数量可能对配体摄取的影响,进一步计算单位受体的结合和摄取配体的情况,SR-A Δ 1-27 的结合和摄取配体的能力约为全长受体的 34.5%(表 1, Table 1)。

2.4 转染细胞的粘附功能

接种相同数量转染细胞于六孔板中,用 EDTA 溶液处理细胞后,计数细胞。结果发现,SR-A Δ 1-27 转

染细胞的细胞数比全长 SR-A 转染细胞减少 8.9%(表 1, Table 1)。

表 1. A 类清道夫受体 N 端第 1~27 位氨基酸胞浆结构域缺失对功能的影响

Table 1. The truncation 1 to 27 amino acid residues of the N-terminal cytoplasmic domain of Scavenger Receptor A mediate the function

分 组	绿色荧光 蛋白强度	红色荧光 蛋白强度	R-G 比值	细胞 粘附率
EGFP	820.1 \pm 40.3	7.3 \pm 1.3	0.009 \pm 0.002	0.506 \pm 0.015
SR-A	285.6 \pm 26.6	28.4 \pm 2.4	0.098 \pm 0.002	0.798 \pm 0.039
SR-A Δ 1-27	358.6 \pm 105.9	11.2 \pm 3.0	0.034 \pm 0.018	0.709 \pm 0.009

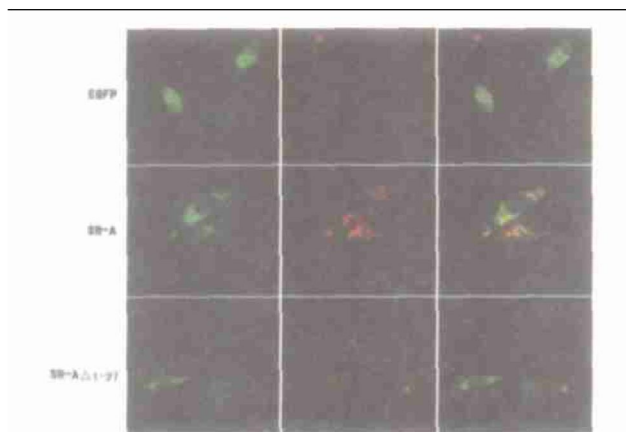


图4. A类清道夫受体和A类清道夫受体N端第1~27位氨基酸胞浆结构域缺失体转染细胞摄取配体的功能

Figure 4. DiI-AcLDL internalization by SR-A or SR-A Δ 1-27 expressed CHO cells

3 讨论

A类清道夫受体(SR-A)在泡沫细胞的形成过程中,通过介导巨噬细胞摄取脂质,导致动脉粥样斑块的形成^[1]。SR-A的胞浆域在受体内移中起重要的作用,其中有一些重要的信号序列如Ser磷酸化位点^[8]、VXFDARS^[9]和KLKSFK^[10]一直是关注的焦点,但确切机制并未阐明。SR-A的胞浆域是一段相对来说并不保守的序列。已知鼠、兔、牛及人的SR-A基因同源性约为60%。我们对鼠、兔、牛和人的胞浆域DNA序列进行分析,发现N端第1~27位氨基酸相对保守,同源性约达到80%,因此认为这段氨基酸序列可能在SR-A功能调节中起更大作用。

为了明确SR-A第1-27位氨基酸序列的确切作用,我们利用基因片断截断技术构建了SR-A第1-27位序列缺失体(SR-A Δ 1-27),并在其N末端接上了GFP示踪蛋白,将其转染入CHO细胞。结果发现,SR-A Δ 1-27也可在CHO细胞中的表达,甚至较全长SR-A的表达还有增高。SR-A Δ 1-27主要分布于细胞膜和细胞浆,但其结合和摄取DiI-AcLDL的能力却明显下降。这与其在细胞中的表达情况相矛盾。理论上受体蛋白的表达升高应该能够增强其功能,但是我们的定性和定量结果却证明,SR-A Δ 1-27摄取配体的能力仅为全长受体的34.5%。这种表达和功能上的不一致,只能说明SR-A胞浆域第1-27位氨基酸序列可能参与介导受体的内移。也许这段序列可能是与胞浆域结合蛋白^[11]相互作用的位点,一旦去

除了这段序列,细胞启动的内移信号转导过程便无法进行。

有趣的是第1-27位氨基酸序列还可能与SR-A在细胞内的定位有关。当AcLDL与SR-A Δ 1-27转染细胞共孵育后,发现部分SR-A Δ 1-27进入细胞核中,而这样的现象在无配体存在情况下并没有出现。这在以往的研究中未见报道,其中的原因和可能的机制还不清楚,尚待深入研究。这种分布异常是否与其摄取配体能力下降之间存在某种关联也值得进一步探索。我们的研究结果还表明,第1-27位氨基酸序列还可能参与SR-A的细胞粘附功能,因为SR-A Δ 1-27转染细胞的粘附能力较全长SR-A下降约8.9%。已知SR-A介导的细胞粘附需要细胞骨架蛋白的参与^[12]。第1-27位氨基酸序列与细胞骨架蛋白之间存在何种联系,也值得进一步研究。

[参考文献]

- [1] Krieger M, Herz J. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptor: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem*, 1994, **63**: 601-637
- [2] Laukkanen J, Lehtolainen P, Gough PJ, Greaves DR, Gordon S, Yla-Herttuala S. 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** (10): 1091-1096
- [3] Kodama T, Freeman M, Rohrer L, Zabrecky J, Matsudaira P, and Krieger M. Type I macrophage scavenger receptor contains α -helical and collagen-like coiled coils. *Nature*, 1990, **343**: 531-535
- [4] 万腊香, 陈修, Chung SK, 吴孟津, 万载阳, 危当恒, 等. 清道夫受体AI转基因小鼠对动脉粥样硬化具有易感性. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (3): 185-189
- [5] 管晓翔, 陈琪, 范乐明. 蛋白激酶C抑制剂Staurosporine对A类清道夫受体胞浆域结构去除后功能的影响. *生物化学与生物物理进展*, 2004, **31** (8): 693-698
- [6] Fong LG. Modulation of macrophage scavenger receptor transport by protein phosphorylation. *J Lipid Res*, 1996, **37** (3): 574-587
- [7] Kosswig N, Rice S, Daugherty A, Post SR. Class A scavenger receptor-mediated adhesion and internalization require distinct cytoplasmic domains. *J Biol Chem*, 2003, **278** (36): 34 219-225
- [8] Fong LG, Le D. The processing of ligands by the class A scavenger receptor is dependent on signal information located in the cytoplasmic domain. *J Biol Chem*, 1999, **274** (51): 36 808-816
- [9] Morimoto K, Wada Y, Hinagata J, Imanishi T, Kodama T and Doi T. VXFD in the cytoplasmic domain of macrophage scavenger receptors mediates their efficient internalization and cell-surface expression. *Biol Pharmac Bull*, 1999, **22** (10): 1 022-026
- [10] Teupser D, Thierry J, Walli AK, Seidel D. Determination of LDL- and scavenger-receptor activity in adherent and non-adherent cultured cells with a new single-step fluorometric assay. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1 303** (3): 193-198
- [11] Nakamura T, Hinagata J, Tanaka T, Imanishi T, Wada Y, Kodama T, Doi T. HSP90, HSP70, and GAPDH directly interact with the cytoplasmic domain of macrophage scavenger receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **290** (2): 858-864
- [12] Steven R, Post, Cecelia Gass, Stuart Rice, Dejan Nikolic, Heather Crump, Ginell R, Post. Class A scavenger receptor mediate cell adhesion via activation of Gi/o and formation of focal adhesion complexes. *J Lipid Res*, 2002, **43**: 1 829-836

(此文编辑 胡必利, 文玉珊)