3　讨论

鉴于 TLR4 已成为脓毒症、脓毒性休克等 LPS 相关疾病治疗的关键靶点[3,4]，同时利用重组可溶性受体可竞争受体与配体的结合的特点，开发受体的拮抗剂，已广泛用于实验和临床研究，有的甚至应用于临床，所以获得可溶性 TLR4 显得非常必要。表达 TLR4 有以下优势：①可溶性 TLR4 本身为 TLR4 的阻断剂，可据此观察可溶性 TLR4 对 TLR4 的拮抗效应；②在此基础上可进一步获得 TLR4 的拮抗短肽，为后期药物开发奠定基础；③可制备全分子抗原的抗体；④因目前还未见可溶性 TLR4 的成功报道，如果获得的可溶性 TLR4 受体的产量足够，也可为 TLR4 的信号转导及其相关领域的研究提供充足的实验材料。我们曾利用原核表达系统获得了 TLR4 可溶性受体[7]，但其包涵体多，复性后活性很低。可能与 TLR4 受体的胞外区有 9 个糖基化位点[12]，不适合用原核表达体系进行表达有关。因此我们利用毕赤酵母 pPIC9K 的表达体系，毕赤酵母（pichia pastoris）基因表达系统是一种新型的外源基因表达系统。为此本研究在前期研究的基础上，利用该系统，初步成功表达了可溶性 TLR4 蛋白。但该方法仍有不足之处，例如：要获得一个高表达的菌株，往往需要进行大量的筛选工作；对蛋白的过度糖基化，增加了表达可溶蛋白的难度等。另外，有人认为有 20% ~ 30% 的蛋白不适合用该系统表达。在实验过程中我们发现，表达某种蛋白可能没有一个固定的模式，某种蛋白最适合哪种表达体系来进行表达，也难以预料。往往需要运用不同的表达载体、采用不同的表达体系才能得出适合的结论。

外源基因的拷贝数是影响其表达量的一个重要因素。一般整合的拷贝数越多，表达量就越高，但并不是绝对的。有时单拷贝和多拷贝对表达量无明显影响，甚至多拷贝的表达量比单拷贝表达量要低。本研究对其他不同 G418 抗性的转化子作初步筛选时发现，TLR4 胞外区基因多拷贝转化子的表达量明显高于单拷贝子，且随基因拷贝数的增加而相应增加（资料未显示）。

我们利用毕赤酵母 pPIC9K 的表达体系，初步表达了可溶性 TLR4 蛋白，尽管目的蛋白占总蛋白量的比例较高，但非常遗憾的是，由于时间方面的限制，我们未能进行大规模的筛选高表达菌株，没有进一步进行高密度发酵实验。我们的目的是初步表达 TLR4 的可溶性受体，并利用它研究其对 TLR4 介导 LPS 对细胞激活效应的拮抗作用，如效果肯定，同时也为进一步获得拮抗多肽奠定基础，也为脓毒症、脓毒性休克的防止提供新的途径。因此，以后的工作应该进行大规模的筛选和诱导，以期能获得高效表达的酵母基因工程菌，进一步表达纯化和功能研究，然后在此基础上筛选拮抗性多肽，为最终获得 TLR4 的新型拮抗剂奠定坚实的基础。

参考文献：

[1] 常　山，张雅萍，赵永亮，等. 鸡抗内毒素卵黄抗体 IgY 的制备[J]. 第三军医大学学报，2002，24(10)：1199－1201.

[2] 梁自文，杨宗城，罗向东，等. 内毒素对培养人脐静脉内皮细胞高能磷酸合成的影响[J]. 第三军医大学学报，2002，24(7)：813－815.

[3] Yang Q W，Zhu P F，Wang Z G，*et al*. TLR4，a novel signal transducer for lipopolysaccharide[J]. J Chin Trau，2002，5(1)：55－58.

[4] Beutler B. TLR4：central component of the sole mammalian LPS sensor [J]. Curr Opin Immun，2000，12(1)：20－26.

[5] 王吉村，刘新平，聂晓燕，等. 盘状结构域受体 2 胞外区的可溶性表达、纯化和功能鉴定[J]. 生物化学与生物物理学报，2001，33(6)：647－652.

[6] 马　骊，王小宁，张智清，等. 人血管内皮生长因子受体配体结合域[J]. 生物化学与生物物理学报，2000，12(1)：463－468.

[7] 段朝霞，蒋建新，杨清武，等. TLR4 胞外段在大肠杆菌中的可溶性表达、纯化及鉴定[J]. 免疫学杂志，2003，19(4)：274－277.

[8] 欧阳立明，张惠展，张嗣良，等. 巴斯德毕赤酵母的基因表达系统研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展，2000，27(2)：151－153.

[9] 杨清武，朱佩芳，王正国，等. 抗人 TLR4 样受体 4 合成肽单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 解放军医学杂志，2002，27(1)：11－12.

[10] 蔡　欣，段聚宝，邹民吉，等. 一种快速鉴定重组酵母克隆的方法[J]. 军事医学科学院院刊，2000，24(2)：151－152.

[11] 颜子颖，王海林 译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京：科学出版社，1996，888－897.

[12] da Silva Correia J D，Ulevitch R J. MD-2 and TLR4 N-linked glycosylations are important for a functional lipopolysaccharide receptor[J]. J Biol Chem，2002，277(3)：1845－1854.

（编辑　王　红）

关于修回稿件附软盘的说明

为缩短学报出版周期，减少编排错误，请作者根据学报编辑部提出的意见对文稿修改后，将修改稿以 Word 格式存入软盘，并请标明软盘中的文件名、作者姓名及稿件编号，连同修改稿一并送交本刊编辑部或通过电子邮件以附件形式发送至学报信箱 E-mail：aammt@mail.tmmu.com.cn（校外稿件请邮寄）。

本刊编辑部