

# 小鼠S100A9蛋白在枯草芽孢杆菌中的表达及生物学活性分析

李婷, 李甜甜, 丁明玲, 彭勇波\*

(中南民族大学 a. 生命科学学院; b. 生物医学研究所; c. 武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室, 武汉 430074)

**摘要** 钙结合蛋白S100A9与细胞炎症应答及肿瘤生长等密切相关, 但对其生物学功能还不十分清楚. 本研究构建了小鼠S100A9基因的枯草芽孢杆菌诱导表达载体, 以期获得具有生物活性的S100A9蛋白并探讨其功能. 采用无缝克隆将小鼠S100A9基因编码区序列克隆至pHT43载体的P<sub>grac</sub>启动子区, 并将重组载体pHT43-S100A9转化至芽孢杆菌WB800N菌株, 经IPTG诱导S100A9蛋白表达. 通过LPS诱导的RAW264.7细胞炎症模型检测了重组蛋白S100A9对炎症应答的调控作用. Western Blot证实了S100A9重组蛋白分泌表达, 且在0.2 mmol/L的IPTG、30 °C的发酵条件下其表达水平最佳. ELISA检测表明S100A9重组蛋白分泌表达量达到了15.47 ng/mL. 分别利用含有1.54、3.09、6.59 ng/mL三种不同浓度S100A9重组蛋白的发酵液上清作用于LPS诱导的RAW264.7细胞, 与空载组比较, 1.54 ng/mL的S100A9重组蛋白能显著抑制LPS诱导的RAW264.7细胞促炎因子TNF- $\alpha$ 及IL-6等的表达( $P < 0.05$ ).

**关键词** S100A9蛋白; 枯草芽孢杆菌; 异源表达; RAW264.7细胞; 炎症因子

中图分类号 Q785 文献标志码 A 文章编号 1672-4321(2025)01-0036-07

doi: 10.20056/j.cnki.ZNMDZK.20250105

## Expression and biological activity analysis of recombinant mouse S100A9 in *Bacillus subtilis*

LI Ting, LI Tiantian, DING Minling, PENG Yongbo\*

(South-Central Minzu University, a. College of Life Sciences; b. Institute for Medical Biology; c. Hubei Provincial Key Laboratory for Protection and Application of Special Plants in Wuling Area of China, Wuhan 430074, China)

**Abstract** Calcium-binding protein S100A9 was associated with inflammatory response and growth of tumors, and the underlying functions remains further defined. To gain recombinant S100A9 protein with biological activity and explore its function, the mouse S100A9 coding sequence was amplified by PCR and cloned into the expression vector of pHT43 and fusion with P<sub>grac</sub> promoter. The recombinant plasmid pHT43-S100A9 was transferred to *Bacillus subtilis* WB800N and induced expression with IPTG. The expressed products were identified by Western Blot; the biological activity of recombined products were analyzed using LPS stimulated RAW264.7 cell. The recombinant bacteria WB800N/ pHT43-S100A9 was induced expression by IPTG. The optimized induction temperature was 30 °C with 0.2 mmol/L IPTG, and the secretory expression level of S100A9 is up to 15.47 ng/mL. To further analyzed the function of recombined protein, the LPS stimulated RAW264.7 cell was treated by the culture supernatants of the recombined *Bacillus subtilis* with different concentration recombiner S100A9 protein (1.54, 3.09, 6.59 ng/mL), and the results showed that the pro-inflammatory factors, including TNF- $\alpha$  and IL-6 were significantly inhibited comparing with the empty vector group.

**Keywords** protein S100A9; *Bacillus subtilis*; heterologous expression; RAW264.7 cell; inflammatory factor

收稿日期 2023-10-24

\*通信作者 彭勇波(1980-), 男, 教授, 博士, 研究方向: 疾病相关基因功能研究, E-mail: 30952054@qq.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(31371307); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(CZZ21005)

S100A9 (S100 calcium binding protein A9) 又名骨髓相关蛋白 14 (Myeloid-related protein 14, MRP14), 是 S100 钙结合蛋白家族中重要的成员, 主要在中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞等免疫细胞中表达<sup>[1]</sup>, 在调控细胞免疫应答和疾病炎症中发挥重要作用。研究表明 S100A9 在肠炎、类风湿关节炎、哮喘等炎症性疾病中的表达被显著上调<sup>[2]</sup>。来源于肥胖病人血液的巨噬细胞高表达 S100A9 且 M<sub>2</sub> 巨噬细胞的分化被抑制, 并导致炎症的持续及组织修复的受损<sup>[3]</sup>。截止目前, 诸多炎症疾病临床主要采用抗炎和抗过敏药物治疗, 但部分西药的副作用较大, 病情易反复<sup>[4]</sup>。而重组 S100A9 蛋白的治疗性使用能抑制糖尿病小鼠的生糖作用并改善高血糖症, 在抑制糖尿病及相关炎症发生中发挥重要的作用<sup>[5]</sup>。对呼吸系统疾病研究也表明在烟草赤星病菌引起的小鼠哮喘中 S100A9 蛋白通过调节适应性免疫应答防止 Th2 介导的小鼠过敏性气道炎症的发生<sup>[6]</sup>; 在 OVA 激发的大鼠哮喘中, 外源 S100A9 蛋白能降低大鼠气道阻力, 对哮喘发挥保护作用<sup>[7]</sup>。体外细胞实验也表明在巨噬细胞中过表达 S100A9 能导致细胞外活性氧 (ROS) 增强, 并显著上调抗炎因子 IL-10 的表达<sup>[8]</sup>。

有研究表明细胞内源性 S100A9 蛋白表达具有促进机体炎症发生和抑制组织损伤的修复, 在机体免疫稳态调控中发挥作用<sup>[9]</sup>, 而外源性 S100A9 重组蛋白使用则能抑制细胞炎症的发生, 但高效获得具有生物活性的 S100A9 重组蛋白是有待进一步解决的问题。枯草芽孢杆菌是广泛使用的益生菌, 具有耐热、抗干燥、便于存储等优点<sup>[10]</sup>。同时, 枯草芽孢杆菌还具有较强的蛋白表达系统和胞外蛋白分泌能力, 目前常被用作异源重组蛋白分泌生产的优势工程菌<sup>[11-12]</sup>。本研究以枯草芽孢杆菌 8 种胞外酶缺失株 *Bacillus subtilis* WB800N 作为 S100A9 蛋白的异源表达宿主, 利用过表达载体 pHT43 构建了一个稳定的枯草芽孢杆菌表达系统, 并利用 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症应答模型对其生物活性进行了初步分析, 以期获得高生物活性 S100A9 重组蛋白和开发具有免疫调节功能的 S100A9 基因工程菌提供实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株、载体与细胞

大肠埃希氏杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$  购于武汉擎

科; 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* WB800N 与载体 pHT43 由华中农业大学农业微生物国家重点实验室张安定教授课题组馈赠; RAW264.7 细胞为本实验室冻存细胞株。

### 1.2 主要试剂

限制性内切酶 *Bam*H I (宝日医); 同源重组酶 (擎科生物); Taq DNA 聚合酶 (博迈德生物科技); 2  $\times$  Hieff Canace<sup>®</sup> Gold PCR Master Mix (上海翊圣); DNA 纯化回收试剂盒 (南京诺唯赞); 质粒提取试剂盒 (康为世纪); 0.22  $\mu$ m 滤膜、IPTG 及 2XYT 培养基 (碧云天); TRIzo RNA 提取试剂盒、逆转录 cDNA 合成试剂盒、蛋白 Marker (上海翊圣)、DMEM 基础培养基和磷酸缓冲液 (美国 Thermo Scientific); 胎牛血清 (德国 PAN-Biotech); 青霉素-链霉素双抗 (北京索莱宝); *Escherichia coli* 055: B5 来源的脂多糖 LPS (lipopolysaccharides, 美国 Sigma); qRT-PCR SYBR Green Mix (上海翊圣); 兔源 P-NF- $\kappa$ B (武汉爱博泰克)、兔源 NF- $\kappa$ B 和  $\beta$ -actin 抗体 (美国 Cell Signaling Technology); 山羊抗兔 IgG 二抗和 RIPA (强) 裂解液 (康为世纪); SDS-PAGE 快速凝胶试剂盒 (碧云天); 小鼠 S100 钙结合蛋白 A9 (S100A9) ELISA 试剂盒 (酶联生物科技)。

### 1.3 重组质粒的构建

PrimerPrimer5.0 软件设计小鼠 *S100A9* 基因 cDNA 全长序列 (GenBank ID: NM\_001281852.1) 的引物。在正向引物 5' 端添加 pHT43 载体含 *Bam*H I 酶切位点的上游同源臂序列 AAAACATCAGCCGTAGGATCC, 正向引物序列如下: 5'-AAAACATCAGCCGTAGGATCCATGGCCAACAAAGCACCTTC-3'; 在反向引物的 5' 端添加 pHT43 载体含 *Bam*H I 酶切位点的下游同源臂序列 GACGTCTAGAGGATCC, 反向引物如下: 5'-GACGTCTAGAGGATCCCTTACTTCCCACAGCCTTTGC-3'。扩增片断全长为 384 bp。提取小鼠脾脏组织总 RNA 反转录后获得 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR。PCR 反应体系为: cDNA 5  $\mu$ L, 正向引物 2.5  $\mu$ L, 反向引物 2.5  $\mu$ L, 高保真酶 25  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 15  $\mu$ L。PCR 反应程序: 98  $^{\circ}$ C, 5 min; 98  $^{\circ}$ C, 10 s, 72  $^{\circ}$ C, 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 32 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min。反应结束后, PCR 产物用胶回收试剂盒回收备用。利用 *Bam*H I 单酶切 pHT43 载体, 电泳后试剂盒回收。随后按无缝克隆试剂盒说明书进行同源重组反应, 体系为: 含同源臂及 *S100A9* 基因 CDS 序列的 PCR 产物 1.8  $\mu$ L, 线性化 pHT43 载体 1.4  $\mu$ L, 同源重组酶 5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 1.8  $\mu$ L, 50  $^{\circ}$ C 反应

15 min. 重组产物 10  $\mu$ L 转化至感受态 DH5 $\alpha$  中, 37  $^{\circ}$ C 摇菌培养 1 h 后, 涂布于含氨苄的 LB 固体培养基过夜培养, 挑取单菌落接种于含氨苄的液体 LB 培养基, 37  $^{\circ}$ C 液体 LB 培养基摇菌培养 12 h, PCR 验证后, 阳性菌提取重组质粒命名为 pHT43-S100A9, 并送至武汉擎科进行测序验证。

#### 1.4 重组质粒转化 *Bacillus subtilis* WB800N 及诱导表达

将重组质粒 pHT43-S100A9 通过化学法转化至 *Bacillus subtilis* WB800N 感受态, 构建重组菌株 WB800N/pHT43-S100A9, 并通过菌液 PCR 进行菌落鉴定. 将重组菌株 WB800N/pHT43-S100A9 和空载对照 WB800N/pHT43 分别接种到 5 mL 含氯霉素的 LB 培养基, 37  $^{\circ}$ C、220 r/min 培养过夜后, 按 1:100 比例接种于培养基中扩大培养至 OD<sub>600</sub> 值为 0.4~0.5 时, 加入 0.2 mmol/L IPTG 分别在 26、28、30、37  $^{\circ}$ C 时进行蛋白诱导表达. 分别取诱导发酵后的离心上清液和菌体沉淀, 菌体通过超声破膜后离心进一步收集上清液和沉淀. 对收集的蛋白样品通过 SDS-PAGE 以及 Western Blot 分析其表达情况。

#### 1.5 重组 WB800N/pHT43-S100A9 菌株 DMEM 上清液的制备

按 1.4 的培养方法过夜培养重组菌株及对照空载菌株后离心获得菌体 (20 mL 2XYT 液体培养基), PBS 漂洗 3 遍. 收集的菌体用等体积的 DMEM 细胞培养基重悬后, 加入 0.2 mmol/L 的 IPTG, 30  $^{\circ}$ C、220 r/min 诱导至 OD<sub>600</sub> 值为 0.8 时 (约 4 h) 停止. 离心收集上清液, 调节 pH 值至 7.0, 用 0.22  $\mu$ m 的滤膜过滤收集滤液. 对经离心得到的发酵液用 DMEM 细胞培养基进行倍比稀释, 将其依次进行 2.5、5、10 倍稀释. 经 ELISA 试剂盒测得发酵液原液中的重组蛋白 S100A9 含量达到 15.47 ng/mL, 经倍比稀释后的测得浓度依次为 6.59、3.09、1.54 ng/mL. 枯草芽孢杆菌空载菌株离心得到的发酵液上清同重组菌株一样进行 2.5、5、10 倍稀释, 处理与重组菌株保持一致。

#### 1.6 QPCR 检测重组蛋白对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症应答基因表达的影响

取对数生长期的细胞, 以  $3 \times 10^5$  个/mL 的密度接种于 6 孔板, 分别设正常对照组 (Control)、LPS 阳性对照组和重组菌上清液低、中、高浓度处理组及空载对照菌上清液低、中、高浓度处理组. 待细胞贴壁后, 处理组分别加入 100 ng/mL LPS 预处理 3 h 后, 添加不同浓度的上清液预处理 21 h 后收集细胞. 其中, 正常对照组不添加 LPS, 用同体积的 DMEM 代

替, LPS 各组均加入 DMEM 至等体积的 DMEM. 分组依次命名为: Control 组、LPS 组、pHT43-L 组、pHT43-M 组、pHT43-H 组、pHT43-S100A9-L 组、pHT43-S100A9-M 组和 pHT43-S100A9-H 组。

Trizol 法提取各组细胞总 RNA, 并合成 cDNA. 以  $\beta$ -actin 为内参, 使用 qPCR SYBR Green 试剂, 通过相对定量方法检测低中高重组菌株上清液对 RAW264.7 细胞  $\beta$ -actin、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-12、IL-10 和 iNOS 等基因表达的影响. 用到的引物见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因名称	引物序列	产物大小/bp
$\beta$ -actin	F: 5'-ACCTTCTACAATGAGCTGCG-3'	148
	R: 5'-CCTGGATAGCAACGTACATGG-3'	
IL-6	F: 5'-TTCCATCCAGTTGCCTTCTT-3'	170
	R: 5'-ATTTCCACGATTTCCAGAG-3'	
TNF- $\alpha$	F: 5'-CTTCTGTCTACTGAACTTCGGG-3'	134
	R: 5'-CAGGCTTGTCACTCGAATTTTG-3'	
IL-12	F: 5'-ACAGATGACATGGTGAAGACG-3'	140
	R: 5'-TCGTTCTTGTAGTTCAGT-3'	
iNOS	F: 5'-CCGAAGCAAACATCACATTCA-3'	101
	R: 5'-GGTCTAAAGGCTCCGGGCT-3'	
IL-10	F: 5'-AGCCGGGAAGACAATAACTG-3'	138
	R: 5'-GGAGTCGGTTAGCAGTATGTTG-3'	

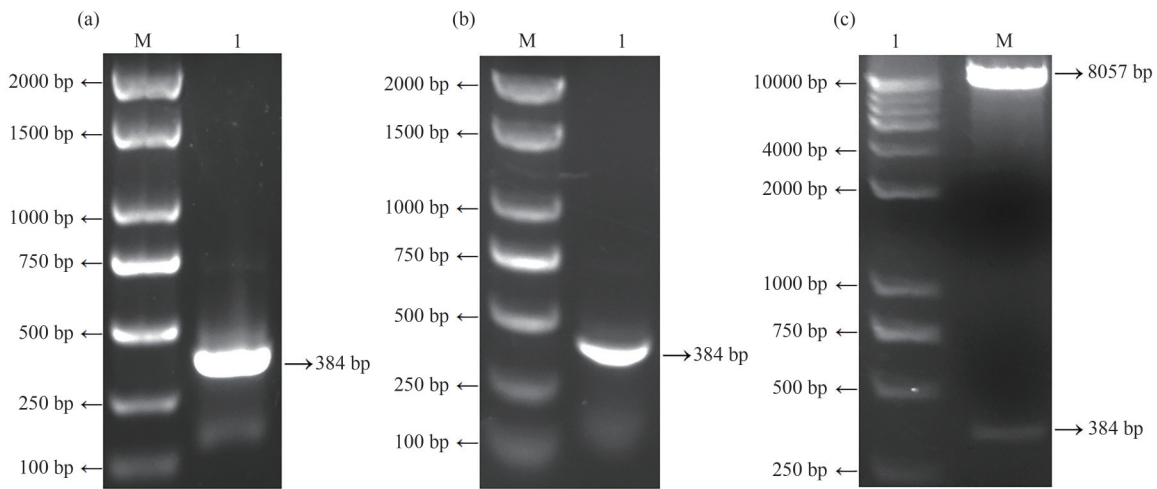
#### 1.7 数据统计分析

SPSS18.0 软件进行统计分析, 结果用“平均值 $\pm$ 标准差 ( $\bar{X} \pm S$ )”表示, 两组间差异显著性检验采用  $t$  检验, 多组间比较采用单因素方差分析. 所有的试验至少重复 3 次,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

#### 2.1 S100A9 目的片段的扩增与 pHT43-S100A9 重组表达载体的构建与鉴定

以小鼠脾脏总 RNA 反转录获得的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 产物回收纯化后获得大小为 384 bp 的片段 (图 1(a)). 将回收的 PCR 产物及单酶切线性化的 pHT43 质粒利用无缝克隆试剂盒进行连接并转化 DH5 $\alpha$  感受态, 挑取单菌落过夜培养后, 经菌液 PCR 检测, 可见一 384 bp 的目的片段 (图 1(b)). 对菌液 PCR 鉴定为阳性的克隆提取重组质粒, 经 BamH 1 单酶切鉴定, 可见一 384 bp 的目的片段 (图 1(c)). 将阳性质粒进行测序分析, 发现 pHT43 插入大小为 384 bp 片段, 与 GenBank 中小鼠 S100A9 基因编码区进行序列比对, 序列同一性为 100%, 表明重组质粒 pHT43-S100A9 构建成功。



(a) M: DNA marker DL2000, 1: *S100A9* 特异性扩增条带; (b) M: DNA marker DL2000; 1: 转化质粒 pHT43-S100A9 抗性平板随机挑选阳性 DH5 $\alpha$  的转化子; (c) M: DNA marker DL10000, 1: 重组质粒 *Bam*H I 酶切后产物, 分别为空载体和目的条带

图 1 pHT43-S100A9/*Bacillus subtilis* WB800N 转化子的 PCR 验证

Fig. 1 Verification of the recombinant pHT43-S100A9/*Bacillus subtilis* WB800N transformants

### 2.2 重组蛋白 S100A9 诱导表达与表达条件优化

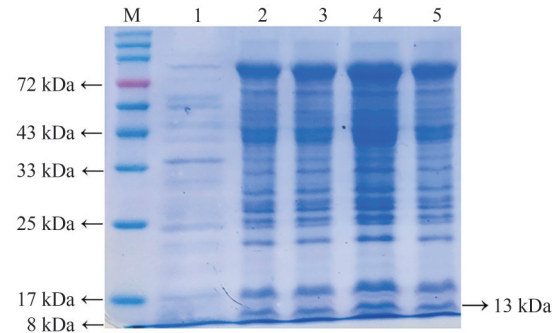
对 S100A9 重组芽孢杆菌的表达产物发酵上清液、芽孢杆菌细胞破膜上清及沉淀的 Tricine-SDS-PAGE 电泳结果显示, 相较于空载对照组, 重组菌株 WB800N/pHT43-S100A9 在 13 kDa 大小附近有一条特异的蛋白条带. 进一步对其诱导表达条件进行优化, 图 2 和图 3 的电泳结果表明: 在 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导及 26、28、30、37  $^{\circ}$ C 不同温度条件进行蛋白含量比较, 在 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导及 30  $^{\circ}$ C 的发酵条件下, 重组蛋白的表达量最高. 进一步通过小鼠 S100A9 蛋白 ELISA 检测试剂盒检测发酵液上清中分泌表达的 S100A9 的浓度. 结果表明, 表达产物上清中 S100A9 浓度最高可达 15.47 ng/mL. 同时, 参考相关文献报道, 本研究分别选择了 1.54 ng/mL、3.09 ng/mL、6.59 ng/mL 作为后续在细胞水平检测重组蛋白生物活性的剂量作为重组蛋白低、中、高剂量处理组.

### 2.3 Western Blot 鉴定重组菌 S100A9 蛋白的表达

以重组空载芽孢杆菌为对照, 检测重组蛋白 S100A9 表达. 结果表明, 阳性重组菌株发酵液上清、菌体破膜上清及破膜沉淀蛋白均与 S100A9 抗体发生了特异性结合, 显示 S100A9 蛋白在枯草芽孢杆菌中实现了表达, 且在胞内表达最多(图 4).

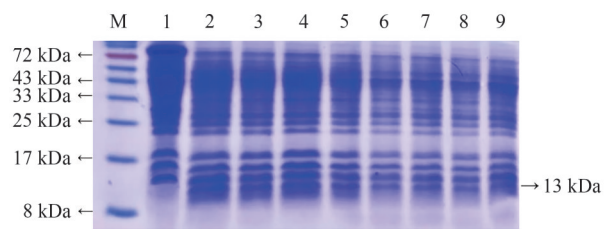
### 2.4 S100A9 重组蛋白对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症因子表达的影响

为初步阐明 S100A9 重组蛋白表达及对细胞功能的调控作用, 进一步制备了重组菌培养物上清, 并探讨了其不同浓度添加对 LPS 诱导的 RAW264.7 细



M: 标准分子量 Marker; 1: 枯草芽孢杆菌空载发酵液上清蛋白阴性对照; 2-5: 依次是重组枯草芽孢杆菌在 26、28、30、37  $^{\circ}$ C 诱导后发酵上清液.

图 2 Tricine-SDS-PAGE electrophoresis of *Bacillus subtilis* WB800N zymotic fluid protein after extraction

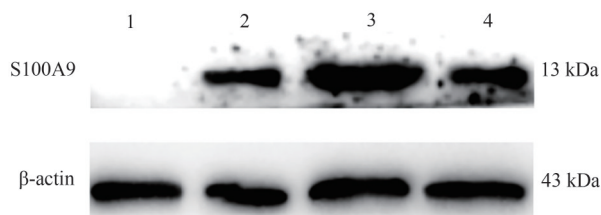


M: 标准分子量 Marker; 1: 枯草芽孢杆菌空载总蛋白阴性对照; 2-5: 依次是重组枯草芽孢杆菌在 26、28、30、37  $^{\circ}$ C 诱导后破膜上清液; 6-9: 依次是重组枯草芽孢杆菌在 26、28、30、37  $^{\circ}$ C 诱导后破膜后沉淀.

图 3 重组枯草芽孢杆菌破膜后上清与沉淀的 Tricine-SDS-PAGE 电泳图

Fig. 3 Tricine-SDS-PAGE electrophoresis of *Bacillus subtilis* WB800N supernatant and precipitate protein after extraction

胞炎症应答的影响. 结果表明: 与正常对照组细胞相比, LPS 可以显著增强 *IL-6*、*IL-1 $\beta$* 、*TNF- $\alpha$* 、*iNOS* 等基因 mRNA 的表达 ( $P < 0.05$ ) 并抑制相关抑炎基因



1: 枯草芽孢杆菌空载体总蛋白阴性对照; 2: 重组枯草芽孢杆菌发酵液上清; 3: 重组枯草芽孢杆菌破膜上清; 4: 重组枯草芽孢杆菌破膜后沉淀。

图 4 重组枯草芽孢杆菌 S100A9 蛋白 Western Blot 鉴定

Fig. 4 Western Blot test of pHT43-S100A9/*B. subtilis* WB800N protein *IL-10* 基因 mRNA 的表达 ( $P < 0.05$ ); 与 LPS 处理组相比, 添加低浓度重组菌株培养物上清, 能显著抑制 *IL-6*、*IL-12*、*TNF- $\alpha$* 、*iNOS* 等促炎相关基因 mRNA 的表达 ( $P < 0.05$ ), 并显著上调 *IL-10* 等抑炎基因 mRNA 的水平 ( $P < 0.05$ ) (图 5)。

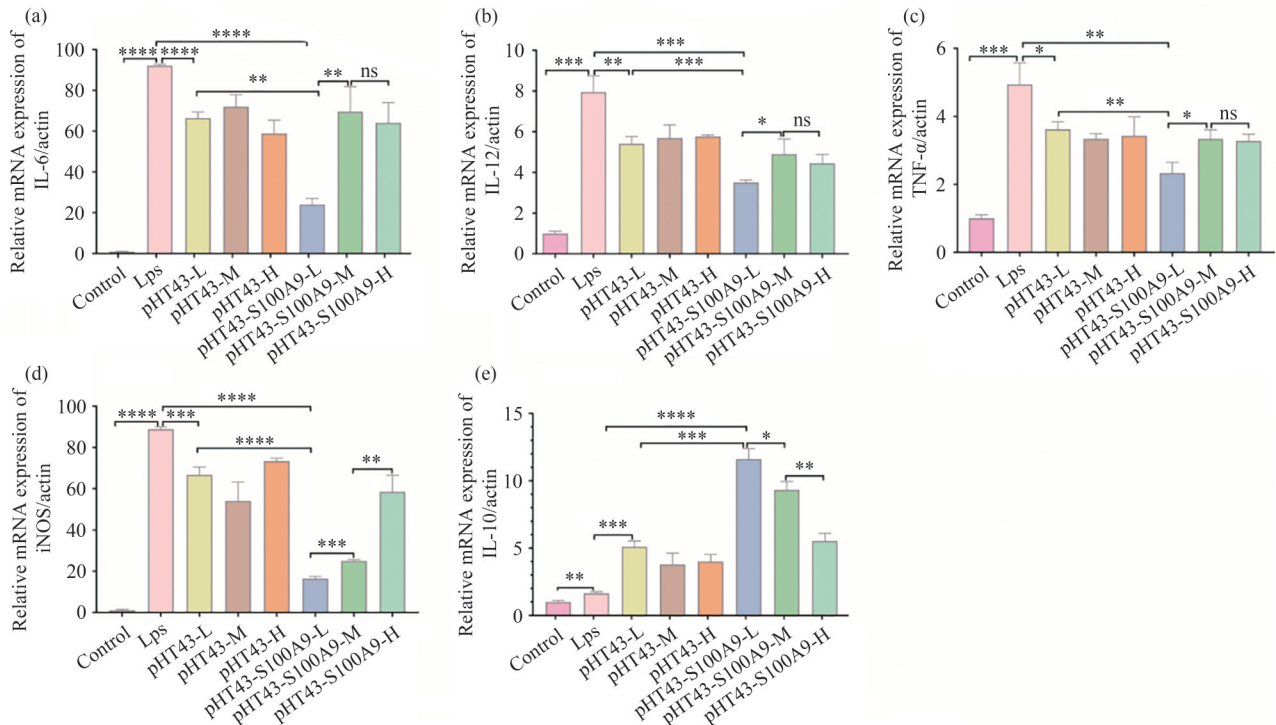
### 2.5 S100A9 重组蛋白对 LPS 诱导的 NF- $\kappa$ B 通路影响

为进一步证明添加低浓度 S100A9 重组蛋白表达产物能抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症, 利用 RT-QPCR、Western Blot 方法检测了其对于 NF- $\kappa$ B 信号通路的影响, 结果如图 6 所示。结果显示 LPS 刺激能显著提高 p65 磷酸化水平, 而添加低剂量的

S100A9 重组蛋白表达产物能显著抑制 LPS 诱导的 NF- $\kappa$ B 通路。

## 3 讨论

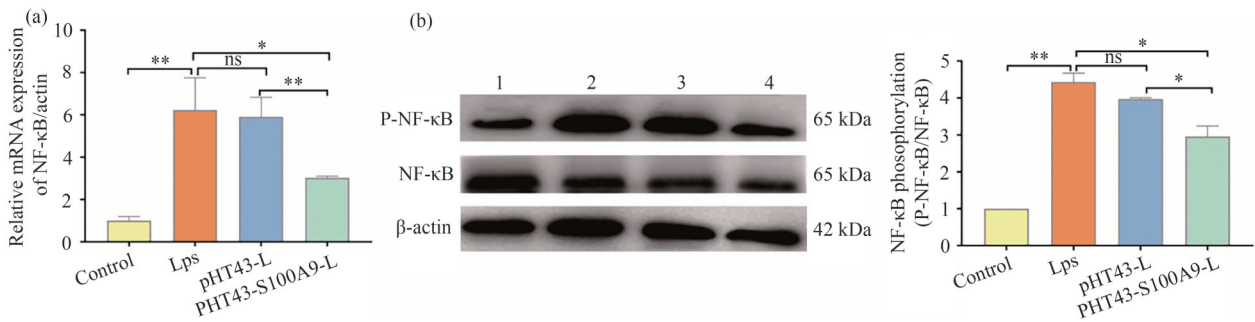
S100A9 蛋白广泛参与调控炎症反应<sup>[13]</sup>。研究表明, S100A9 蛋白存在抗炎与促炎的双重作用, S100A9 蛋白在局部炎症组织中表达增加能激活相应的炎症应答, 并促进炎症发生; 而低剂量外源 S100A9 蛋白的干预则能抑制炎症发生<sup>[9]</sup>。近年, 有研究指出 S100A9 蛋白参与多种肿瘤的发生, 是潜在的肿瘤标志物之一<sup>[14]</sup>。对 S100A9 蛋白调控机体免疫应答机制的研究表明 S100A9 蛋白可通过调节促炎介质的产生发挥炎症调控作用<sup>[15]</sup>; 同时, S100A9 蛋白还能通过调控巨噬细胞的增殖和凋亡等过程抑制巨噬细胞的促炎活化<sup>[16]</sup>。因此, S100A9 重组蛋白在调控机体免疫稳态和肿瘤标志物的检测等方面具有潜在应用价值。但如何高效获取具有生物活性的 S100A9 重组蛋白, 是以 S100A9 为靶点的炎症疾病治疗首要解决的问题。本实验成功将小鼠 *S100A9* 基因在枯草芽孢杆菌 WB800N 中表达, 且蛋白免疫印迹实验表



(a) 低浓度重组蛋白 S100A9 明显抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞促炎因子 IL-6 的表达, \*\*\*\* $P < 0.0001$ ,  $n=3$ ; (b) 低浓度重组蛋白 S100A9 明显抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞促炎因子 IL-12 的表达 \*\*\* $P < 0.001$ ,  $n=3$ ; (c) 低浓度重组蛋白 S100A9 明显抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞促炎因子 TNF- $\alpha$  的表达 \*\* $P < 0.01$ ,  $n=3$ ; (d) 低浓度重组蛋白 S100A9 明显抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 iNOS 的表达 \*\*\*\* $P < 0.0001$ ,  $n=3$ ; (e) 低浓度重组蛋白 S100A9 明显促进 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞抑炎因子 IL-10 的表达 \*\*\*\* $P < 0.0001$ ,  $n=3$

图 5 重组蛋白 S100A9 对 RAW264.7 细胞炎症相关基因 mRNA 表达的影响

Fig. 5 Effects of pHT43-S100A9/*Bacillus subtilis* WB800N protein on mRNA expression of RAW264.7 cell inflammatory



(a) RAW264.7 细胞 NF-κB p65 的 mRNA 表达 \* $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ; (b) 1: Control; 2: LPS; 3: pHT43-L; 4: pHT43-S100A9-L; LPS 组显著促进 NF-κB p65 通路蛋白的磷酸化 \* $P < 0.01$ ,  $n = 3$ , 而低浓度重组 S100A9 蛋白抑制该蛋白的磷酸化, \* $P < 0.05$ ,  $n = 3$ 。

图 6 低浓度重组 S100A9 蛋白对 RAW264.7 细胞 NF-κB 通路的影响

Fig. 6 Effects of pHT43-S100A9-L on NF-κB p65 related proteins of RAW264.7

明表达的重组蛋白具有反应原性;进一步将重组表达产物作用于 LPS 诱导的巨噬细胞炎症应答,发现 S100A9 蛋白能显著抑制炎症相关基因表达和 NF-κB 蛋白磷酸化水平,这为研究利用枯草芽孢杆菌表达体系高效获得具有生物活性的 S100A9 重组蛋白及基于 S100A9 为靶点的炎症疾病治疗奠定了研究基础。

枯草芽孢杆菌是一个具有能将外源蛋白产物分泌到胞外、不含内毒素、没有明显的密码子偏好性等突出优点的外源蛋白表达系统<sup>[17]</sup>。选择具有高表达活性的启动子是实现外源蛋白表达的关键,本研究选用具有高拷贝及诱导型表达的 *Pgrac* 启动子为目的基因 *S100A9* 的表达启动子,构建了小鼠 *S100A9* 基因的重组表达质粒,并实现了其在枯草芽孢杆菌 WB800N 中的诱导型分泌表达,且分泌表达量最高可达 15.47 ng/mL。

维持重组蛋白的生物学活性是将其应用于疾病治疗或诊断的前提,研究结果显示重组蛋白 S100A9 处理巨噬细胞后,促炎相关因子的表达受到显著抑制,这表明重组蛋白在细胞炎症应答调控中发挥了重要的作用,这也与有关外源 S100A9 蛋白对炎症应答调控效应的报道一致<sup>[18]</sup>。

#### 参 考 文 献

- [1] KADOMATSU K, TOMOMURA M, MURAMATSU T. cDNA cloning and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages of embryonal carcinoma cells and in mid-gestation period of mouse embryogenesis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, 151(3) : 1312-1318.
- [2] VOGL T, EISENBLATTER M, VOLLER T, et al. Alarmin S100A8/S100A9 as a biomarker for molecular imaging of local inflammatory activity [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 4593.
- [3] FRANZ S, ERTEL A, ENGEL K M, et al. Overexpression of S100A9 in obesity impairs macrophage differentiation via TLR4-NFκB-signaling worsening inflammation and wound healing [J]. *Theranostics*, 2022, 12(4) : 1659-1682.
- [4] 沈金花, 邱海婷. 凤尾草乙醇提取物舒张小鼠气管平滑肌作用机理[J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2021, 40(02) : 138-143.
- [5] URSINO G, RAMADORI G, Hoßler A, et al. Hepatic non-parenchymal S100A9-TLR4-mTORC1 axis normalizes diabetic ketogenesis [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1) : 4107.
- [6] PALMER L D, MALONEY, BOYD K L, et al. The innate immune protein S100A9 protects from T-Helper cell type 2-mediated allergic airway inflammation [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2019, 61(4) : 459-468.
- [7] YIN L M, LI H Y, ZHANG Q H, et al. Effects of S100A9 in a rat model of asthma and in isolated tracheal spirals [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 398(3) : 547-552.
- [8] YANG J, ANHOLTS J, KOLBE U, et al. Calcium-binding proteins S100A8 and S100A9: Investigation of their immune regulatory effect in myeloid cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7) : 1833.
- [9] WANG S, SONG R, WANG Z, et al. S100A8/A9 in inflammation [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1298.
- [10] LIN P, YUAN H, DU J, et al. Progress in research and application development of surface display technology using *Bacillus subtilis* spores [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(6) : 2319-2331.
- [11] FU G, LIU J, LI J, et al. Systematic screening of optimal signal peptides for secretory production of heterologous proteins in *Bacillus subtilis* [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(50) : 13141-13151.
- [12] ZHANG G, LIN M, QIN M, et al. Establishing

- heterologous production of microcins J25 and Y in *Bacillus subtilis* [J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(14) : 5600-5613.
- [13] TOLEIKIS Z, ZIAUNYS M, BARANAUSKIENE L, et al. S100A9 alters the pathway of Alpha-synuclein amyloid aggregation [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15).
- [14] CHEN X, XUE Y, FENG J, et al. Identification S100A9 as a potential biomarker in neuroblastoma [J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(12) : 7743-7753.
- [15] SHIMIZU K, LIBBY P, ROCHA V Z, et al. Loss of myeloid related protein-8/14 exacerbates cardiac allograft rejection [J]. *Circulation*, 2011, 124(25) : 2920-2932.
- [16] DE LORENZO B H P, GODOY L C, NOVAES E BRITO R R, et al. Macrophage suppression following phagocytosis of apoptotic neutrophils is mediated by the S100A9 calcium-binding protein [J]. *Immunobiology*, 2010, 215(5) : 341-347.
- [17] NAYAK S K. Multifaceted applications of probiotic *Bacillus* species in aquaculture with special reference to *Bacillus subtilis* [J]. *Rev Aquac*, 2020, 13(2) : 862-906.
- [18] VOGL T, STRATIS A, WIXLER V, et al. Autoinhibitory regulation of S100A8/S100A9 alarmin activity locally restricts sterile inflammation [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(5) : 1852-1866.

(责编&校对 姚春娜)