

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*

管晓翔^{1,2)} 陈 琪¹⁾** 范乐明¹⁾

(¹⁾南京医科大学动脉硬化研究中心, 南京 210029; ²⁾南京军区南京总医院肿瘤科, 南京 210002)

摘要 A 类清道夫受体 (scavenger receptor, SR-A) 是一种主要位于巨噬细胞膜表面的同源三聚体糖蛋白, 能够结合和摄取多种配基并介导内移。在清道夫受体胞浆域有几个潜在的磷酸化位点, 有关这些磷酸化位点与受体功能之间的确切关系目前尚所知甚少。为深入探讨 A 类清道夫受体胞浆域与磷酸化之间的关系, 以及受体胞浆域磷酸化对受体功能的影响, 实验以含有 SR-A cDNA 质粒为模板, 采用 PCR 方法扩增不含胞浆域序列的清道夫受体, 同时扩增全长清道夫受体作为对照。PCR 产物经纯化酶切后, 进一步亚克隆到 pCDNA3.1/HisB 中, 测序结果表明, 重组产物能够编码正确的氨基酸序列。重组产物经脂质体 Lipofectamine (LF2000) 介导转化入 CHO 细胞中, 在含 G418 选择性培养液中培养筛选 14 天后, 分离阳性克隆, 继续培养。采用流式细胞计数仪 (FACS) 鉴定转化筛选后细胞能否表达具有功能的清道夫受体。结果发现, 转化的 CHO 细胞可以稳定表达 SR-A 的蛋白质, 但受体胞浆域去除后, 摄取配基的能力明显弱于全长组 (1:1.337)。用荧光 DiI 标记乙酰化低密度脂蛋白 (DiI-AcLDL), 37°C 孵育转化细胞 5 h 后, 激光共聚焦显微镜下观察到: 全长受体转化组细胞荧光散在分布于细胞膜和细胞器, 而去除胞浆域组荧光只局限于细胞膜, 说明 SR-A 胞浆域可能起着介导受体内移的作用。进一步比较蛋白激酶 C 抑制剂星形孢菌素 (staurosporine, STA) 对两组细胞受体功能的影响, 发现经 STA 处理后, 全长组受体与配基的结合及摄取明显增高, 而胞浆域去除后受体不受 STA 的调控。从而证明磷酸化药物可能是通过改变 SR-A 胞浆域磷酸化水平而发挥作用, 受体胞浆域磷酸化可能决定着受体的内移, 并参与调节受体的活性。

关键词 A 类清道夫受体, 胞浆域, 磷酸化, 蛋白激酶 C 抑制剂

学科分类号 Q78

清道夫受体是一种主要位于巨噬细胞膜表面的内移性受体, 存在受体再循环机制。同步代谢实验结果显示: 当配体与其结合后, 可发生受体介导的内吞而进入胞浆, 它们从细胞膜消失一半的时间为 2.8 min (half life), 7.5 ~ 10 min 后可观察到配体被运输到溶酶体并且被降解^[1], 这种高效率的转运提示受体的内移一定由某种精确的机制参与调控。在其他内移型的受体, 其内移通常是由受体胞浆域中蛋白质磷酸化反应所调节或由胞浆域的信号序列引导, 可见胞浆域对于受体的内移是非常重要的。目前的研究发现, SR-A 胞浆域 50 个氨基酸序列中有几个潜在的磷酸化位点, 在分别和联合去除这几个磷酸化位点后可以改变受体活性^[2]。最近 Fong 等^[3] 也报道激酶抑制剂 C 星形孢菌素 (staurosporine, STA) 能抑制清道夫受体介导的内吞作用, 此外, 受体内吞的抑制也伴有受体磷酸化的抑制, 由此提示受体介导的内吞和受体磷酸化之间似乎存在一定的联系, 但其确切机制尚待进一步阐明。为进一步明确受体胞浆域与磷酸化之间的关

系, 本实验用药物改变细胞内磷酸化水平, 分析清道夫受体对配基的结合和摄取改变。本研究以分析 STA 对清道夫受体活性影响的分子机制为起点, 进而探索受体胞浆域磷酸化对受体结合和摄取配基功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

岩藻多糖, 蛋白激酶 C 抑制剂 STA 为美国 Sigma 公司产品; DMEM/F12 为美国 Gibco 公司产品; 荧光染料 DiI 为美国 Molecular Probe 公司产品; 抗-myc 抗体 (9E10, Santa Cruz, Biotechnology 公司产品, 哈佛大学医学院何志刚博士馈赠); DNA 回

* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (TG200056910) 和江苏省科委应用基础研究资助项目 (BK2001113)。

** 通讯联系人。

Tel: 025-86662610, Fax: 025-86508960

E-mail: qichen@njmu.edu.cn

收稿日期: 2004-02-23, 接受日期: 2004-04-07

收试剂盒为 Millipore 公司产品; 限制性内切酶为 TaKaRa 公司产品; T4 DNA 连接试剂盒为 MBI 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 低密度脂蛋白的制备、修饰、标记、鉴定: 常规分离健康人空腹血清, 序列超速离心低密度脂蛋白 (LDL), 所得 LDL 用 PBS 透析、滤菌后 BCA 法测蛋白质浓度, 4℃ 保存. LDL 的 DiI 标记及乙酰化参照文献 [3, 4], 标记率为 30 $\mu\text{g/g}$ (每克脂蛋白标记 30 μg), 乙酰化修饰后相对于天然 LDL 琼脂糖凝胶电泳迁移率为 2.8. 无脂血清 (LPDS) 为超滤副产物, 用时需恢复至原体积, 滤菌后加入细胞培养液中备用.

1.2.2 质粒构建: 以牛 A 类 II 型清道夫受体 (SR-A II) 的 cDNA (美国麻省理工大学 Krieger 教授馈赠) 为模板, PCR 方法扩增胞浆域去除全部序列的无尾型突变 SR-A, 同时扩增全长清道夫受体作为对照, 引物如下: 引物 A 为 5' CGGAAT-TCTATGACTGCACTGATCACCCTTTATC 3', 引物 B 为 5' CGGAATTCTATGGCACAGTGGGATGACTTTC 3', 引物 C 为 5' CCGCTCGAGTATCCTGTCTTTGC-ATGCTTCCA 3' (引物 A 和 C 用于全长 SR-A, 引物 B 和 C 用于突变型 SR-A), 94℃ 预变性 5 min (1 min 后加 pfu DNA 扩增酶), 94℃ 变性 30 s、58℃ 退火 60 s、72℃ 延伸 50 s, 共 25 个循环. 以上 PCR 产物及 PcDNA3.1 以限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 37℃ 酶切 2 h 后, 用 Millipore 公司 DNA 回收试剂盒回收, T4 DNA 连接试剂盒 22℃ 连接 2 h, 再以 0.1 mol/L CaCl_2 转化大肠杆菌 DH5 α 后, 均匀涂布于含有氨苄青霉素的 LB 平板筛选阳性克隆, 扩增后基因测序表明, 核苷酸序列编码的氨基酸正确, 而且在 SR-A 羧基端融合 PcDNA3.1 的 myc 短肽, 实验中可以用抗 myc 的抗体来检测 SR-A 的表达.

1.2.3 细胞培养及稳定转化: CHO 细胞用含 10% 小牛血清 DMEM/F12 培养基 37℃、5% CO_2 培养. 转化前 24 h, 以 0.125% 胰酶消化细胞, 以 5×10^5 /孔的浓度接种 6 孔板. 转化采用脂质体 (Lipofectamine 2000) 法, 将 5 μg 质粒 DNA 和 10 μl 脂质体分别加入 100 μl 无 FCS 的 DMEM/F12 中, 再将以上两种液体轻轻混匀, 室温静置 20 min, 摇匀后, 滴加至 6 孔板的每一孔中, 标准条件下培养 4~6 h 后更换新鲜培养液, 次日用含 800 mg/L G418 的培养基连续筛选 2 周, 挑取单个克

隆扩增, 用含 400 mg/L G418 的培养基继续培养.

1.2.4 流式细胞计数仪定量分析转化基因的表达及功能: 为鉴定 SR-A 在稳定转化 CHO 细胞中的表达, 用 0.125% 胰酶消化, 离心收集, PBS 洗 3 次, 再用 PBS 重悬细胞, 细胞密度约 5×10^5 /ml, 抗 myc 抗体在 4℃ 孵育 30 min, 离心收集, PBS 洗 3 次, 再用 FITC 标记的 IgG 4℃ 孵育 30 min, 离心后重悬于 300 μl PBS, 立即应用流式细胞计数仪 (FACS, Becton Dickinson) 获取 10 000 个细胞, 定量分析 SR-A 基蛋白在 CHO 表达. 为进一步鉴定其功能, 用 5 mg/L DiI-AcLDL 37℃ 孵育 2 h 后, 离心收集, PBS 洗 3 次, 重悬 FACS 鉴定 SR-A 功能.

1.2.5 激光共聚焦显微镜观察配基的内移过程: 转化细胞以 5×10^5 /ml 的密度接种于 6 孔板, 5 mg/L DiI-AcLDL 37℃ 孵育 5 h 后, PBS 洗 3 次, 在激光共聚焦显微镜 (Axiovert, Zeiss) 下, 选择合适的滤镜观察 DiI-AcLDL 的分布.

1.2.6 药物对清道夫受体活性的影响测定: 药物对受体活性的影响按以下方法测定: STA (终浓度 0.4 $\mu\text{mol/L}$) 37℃ 作用于细胞 1 h, 用 PBS 洗 3 次, 按要求加入含 DiI-AcLDL 的完全培养基. 测受体结合时, 细胞用冰预冷 15 min, 加入等量的含 10% FCS 的 DMEM/F12, 再加入 DiI-AcLDL (终浓度 10 mg/L), 于 4℃ 孵育 2 h, 测受体摄取时, 加入 DiI-AcLDL (终浓度 10 mg/L) 完全培养基于 37℃ 孵育 2 h. 孵育结束后细胞以 PBS 2 次清洗后, 选定激发波长和发射波长分别为 549 nm 和 564 nm, 测定荧光强度^[5]. 同时用 BCA 法测定蛋白质浓度. 实验设竞争组和非竞争组, 竞争组加入 200 mg/L 岩藻多糖 (fucoidin) 抑制受体的特异性途径, 非竞争组的荧光强度减去竞争组的荧光强度为细胞表面受体特异性结合值.

1.2.7 统计方法: 采用 SPSS10.0 统计软件分析.

2 结 果

2.1 重组产物鉴定及其在转化细胞的情况

以野生型清道夫受体为模板, 扩增出全长清道夫受体及胞浆域去除的清道夫受体, 双酶切后重组于 PcDNA3.1 载体, 转化到大肠杆菌 DH5 α 后均匀涂布于含有氨苄青霉素的 LB 平板筛选阳性克隆, 阳性克隆扩增后抽提质粒 DNA, 双酶切鉴定示重组的 PcDNA3.1 载体分别包含有全长和胞浆域去除的清道夫受体, 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 限制性内切酶酶切作用后可获得特异的条带, 分子质量分别为

1 047 bp和897 bp (图 1)。TaKaRa 公司进行基因测序表明,清道夫受体基因已经重组于 PcDNA3.1 载体中,开放性阅读框正确。在质粒 PcDNA3.1/hisB 的启动子下游有一个由 10 个氨基酸组成的多肽 myc,当外源基因亚克隆在 PcDNA3.1/hisB 质粒中时,就与 myc 形成融合蛋白,即 myc 与清道夫受体基因的表达水平一致。故可以用抗 myc 的抗体检测 myc 的表达代替对 SR-A 表达的分析。FACS 可见 G418 筛选的 CHO 细胞,可以稳定高效表达正常清道夫受体及突变的清道夫受体蛋白,而且两者在蛋白质表达水平上没有显著差异,全长型和胞浆域去除型清道夫受体在 CHO 表达分别为 76.4% 和 77.9% (图 2)。

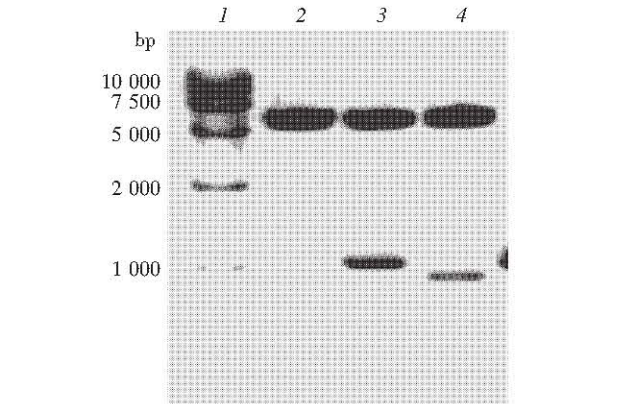


Fig. 1 Agarose gel electrophoretic analysis of recombinant cDNA of PcDNA3.1/SR-A cleaved with *Eco*RI and *Xho*I
1: DNA marker; 2: Empty vector; 3: Full length SR-A II; 4: Truncated SR-A II.

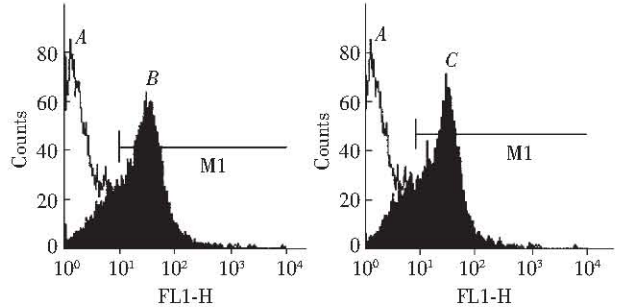


Fig. 2 Flow cytometry quantitation of myc expression in CHO cells which were transfected with the empty pcDNA3.1 vector (A), the full-length MSR-A DNA (B), and the truncated MSR-A DNA (C)
The results indicate equally efficient expression of the full-length MSR-A (76.4%) and the truncated MSR-A (77.9%). These results were representatives of three separate experiments.

2.2 稳定表达 SRA 的 CHO 细胞摄取功能
未转化的 CHO 细胞膜表面没有清道夫受体,因此不能结合和摄取 DiI-AcLDL。而稳定转化两种清道夫受体基因后,CHO 细胞具有结合或摄取荧光标记的配基功能,且高浓度未标记的配基能够竞争性抑制以上这种过程,说明清道夫受体基因在转化的 CHO 细胞膜表面表达,并具有特异性结合和摄取的功能,但受体胞浆域去除后摄取配基的能力明显弱于全长组 (1: 1.337) (图 3)。

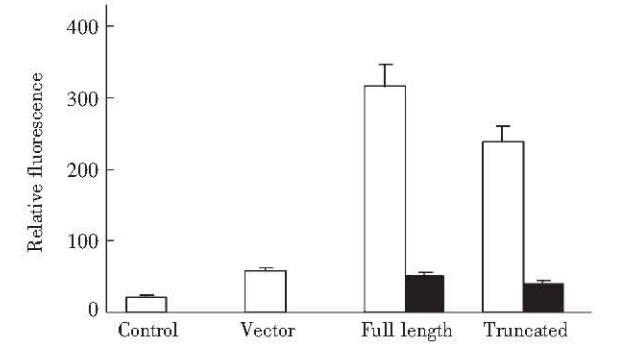


Fig. 3 Flow cytometry analysis of DiI-AcLDL binding to the non-transfected and transfected CHO cells

The non-transfected CHO cells and CHO cells transfected with the empty vector, the full-length MSR-A DNA, and the truncated MSR-A were incubated with 5 mg/L DiI-AcLDL for 2 h at 37°C, washed off un-bound LDL, and analyzed using flow cytometry. Uptake of DiI-AcLDL was quantified by the relative fluorescence associated with the cells. The cells transfected with the full-length MSR-A DNA displayed much stronger fluorescence than the non-transfected cells and those transfected with the empty vectors. The relative fluorescence of the cells transfected with the full-length MSR-A (316.8) was higher than that of the cells transfected with the truncated MSR-A (237.0). DiI-AcLDL binding to the transfected cells was competitively inhibited in the presence of 200 mg/L fucoidan. The difference between the DiI-AcLDL binding to the transfected cells in the presence and absence of fucoidan indicated a 16.3% non-specific membrane binding of the fluorescent probe. □: 5 mg/L DiI-AcLDL; ■: Competence.

2.3 胞浆域去除后清道夫受体介导配基内移的改变
以上的实验提示清道夫受体胞浆域去除后受体介导的内移受到抑制,为进一步在形态学观察受体胞浆域与受体内移的关系,我们应用共聚焦显微镜以 2 μm 单位为断层进行连续扫描,观察荧光染料标记的配基 DiI-AcLDL 在 37°C 孵育细胞 5 h 后荧光分布的改变。结果发现胞浆域去除后 DiI 分布于细胞膜,并不进入细胞胞浆内,而对照组野生型 SR-A 却进入胞内,说明清道夫受体在去除胞浆域

后仍能在细胞膜表达, 但并不能介导配基-受体复合物的内移, 由此可见, 清道夫受体胞浆域可能存

在某种序列决定受体的内移 (图 4).

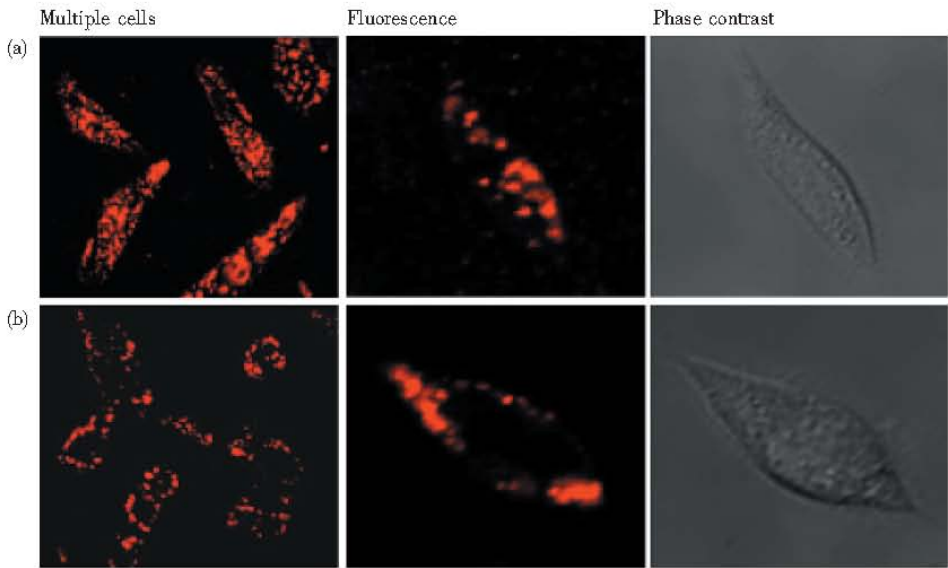


Fig. 4 Confocal microscopy analysis of the processing of DiI-AcLDL uptaken by full length (a) and truncated (b) SR-A transfected CHO cells at 37°C for 5 h

(a) The full length SR-A can internalize DiI-AcLDL at 37°C for 5 h, DiI was decentralized in the cytoplasm cell organs as well as cell membrane.
(b) Cytoplasmic domain-truncated SR-A transfected CHO cells, DiI-AcLDL was mostly detained at the cell membrane.

2.4 磷酸化药物 STA 对受体活性的影响

清道夫受体胞浆域有磷酸化位点, 磷酸化药物可以改变受体活性, 为阐明磷酸化药物对受体活性改变与受体胞浆域磷酸化位点之间的关系, 我们观察磷酸化药物 STA 对胞浆域去除受体活性的影响, 结果发现磷酸化药物抑制剂 STA 可以增强全长受

体的结合和摄取, 药物作用组受体的结合和摄取与无药物作用组比较有显著差异, 但药物却不能改变胞浆域去除受体的活性, 药物组与对照比较无显著性差异 (图 5 和图 6).

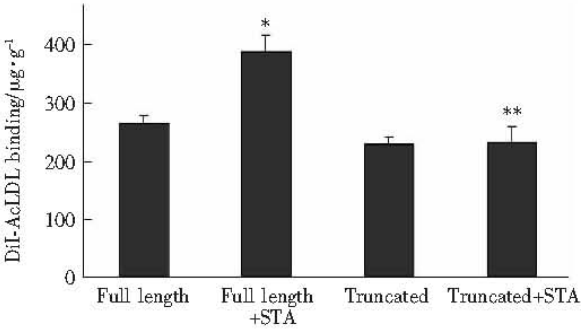


Fig. 5 Comparison of DiI-AcLDL bind to full length and truncated SR-A transfected CHO cells treated with staurosporine

CHO cells were preincubated with staurosporine for 1 h at the concentration of 0.4 μmol/L. Then cells were refed with medium containing DiI-AcLDL at the concentration of 10 mg/L at 37°C for 2 h, the DiI specially bind to cells was measured by spectrofluoremeter (n = 3, *P < 0.01 vs full length group; **P > 0.05 vs truncated group).

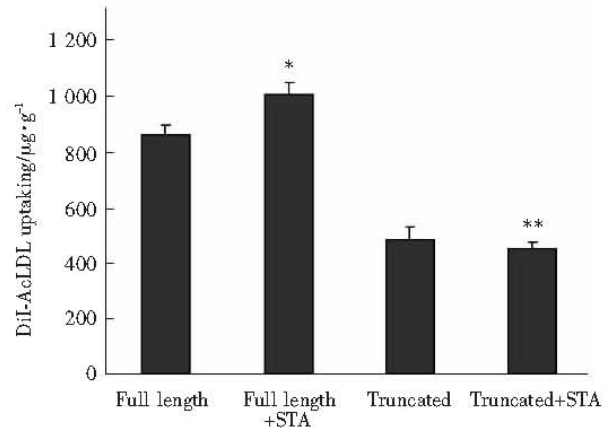


Fig. 6 Comparison of DiI-AcLDL uptaken by full length and truncated SR-A transfected CHO cells treated with staurosporine

CHO cells were treated with staurosporine as described above and then the cells were incubated with various concentrations at 37°C for 2 h. The DiI specially uptaken by cells was measured as above describe (n = 3, *P < 0.01 vs full length group; **P > 0.05 vs truncated group).

3 讨 论

清道夫受体胞浆域一级结构表明, 每个单体的胞浆域含有 3 个可被磷酸化的丝氨酸/苏氨酸位点和 1 个酪氨酸磷酸化位点, 以上位点的去除可以明显影响受体的功能^[2], 由此可见, SR-A 胞浆域的磷酸化水平与受体本身的功能密切相关, 但确切机制并未阐明^[3]. 本实验室用药物 STA 调节 U937 细胞内蛋白质磷酸化/去磷酸化水平, 结果发现细胞内蛋白质磷酸化/去磷酸化可以影响细胞 SR-A 的活性及受体转运^[6,7]. 由于 staurosporine (STA) 是一种广谱蛋白激酶抑制剂, 可以广泛抑制细胞内蛋白丝氨酸/苏氨酸和酪氨酸磷酸化, 磷酸化药物作用的非特异性, 使实验结果不能确切说明磷酸化药物是通过改变清道夫受体胞浆域磷酸化水平而发挥作用的. 因此, 药物磷酸化的作用与受体胞浆域功能之间的确切关系并不完全清楚. 进一步去除受体胞浆域后, 可以观察到磷酸化药物 STA 并不能改变胞浆域去除的突变型受体活性, 而对正常受体仍可以改变受体活性, 提示 STA 有可能是通过调节清道夫受体胞浆域本身磷酸化水平而发挥作用, 清道夫胞浆域可能发生磷酸化反应, 而这种磷酸化可能借助某种胞浆域结合蛋白与细胞内信号转导相关联, 从而影响受体的结合和摄取等功能. 在清道夫受体胞浆域存在一些胞浆域结合蛋白^[8,9], 可以与清道夫受体胞浆域相互作用而调节受体活性.

我们的研究也发现清道夫受体胞浆域结构去除后, 突变受体只分布于细胞膜表面, 在胞浆中几乎完全消失, 同时受体介导的配体内迁移率明显减少, 受体的内移完全阻断, 说明清道夫受体胞浆域存在信号序列介导了受体的内移, 可能因为胞浆域结构的去除或空间构象的改变, 从而不能与胞浆域结合蛋白相互作用, 而这种相互作用可能是介导受体内移等功能的重要分子基础. 但是本研究仍不能完全说明磷酸化位点就是介导受体内移的确切序列, 因为除了磷酸化位点以外, 在清道夫受体胞浆域序列中 FDARS^[10] 和 VXFD^[11] 以及 Leu³²Leu³³ 结构^[12]被认为是内移信号序列的最可能候选序列, 临近 Asp²⁵ 的序列也可能是一种内移信号序列^[13]. 但是, 单独去除包括磷酸化位点、FDARS、VXFD 及临近 Asp²⁵ 序列在内的 4 种结构都不能完全阻断

受体介导的内移, 由此我们推断在清道夫受体胞浆域存在多个信号序列介导受体的内移, 而且受体的内移需要这些序列之间的在时间和空间上的相互协调. 但目前尚未在 SR-A 的胞浆域中发现有确切的内移信号序列的存在^[11], 因此, 对于受体胞浆域确切的信号序列需要进一步进行定点诱变技术后才能确定.

参 考 文 献

- 1 Fong L G, Fong T A, Cooper A D. Inhibition of mouse macrophage degradation of acetyl-low density lipoprotein by interferon-gamma. *J Biol Chem.* 1990, **265** (20): 11751 ~ 11760
- 2 Fong L G, 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): 36808 ~ 36816
- 3 Fong L G. Modulation of macrophage scavenger receptor transport by protein phosphorylation. *J Lipid Res.* 1996, (3): 574 ~ 587
- 4 Teupser D, Thiery J, Walli A K, *et al.* 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, **1303** (3): 193 ~ 198
- 5 Stephan Z F, Yurachek E C. Rapid fluorometric assay of LDL receptor activity by DiI-labeled LDL. *J Lipid Res.* 1993, **34** (2): 325 ~ 330
- 6 Jin Y, Chen Q, Wang N, *et al.* Effect of protein kinase C inhibitor on scavenger receptor in human U937 macrophage-like cells. *Acta Biochem Biophys Sin.* 1999, **31** (4): 395 ~ 399
- 7 Jin Y, Chen Q, Wei E H, *et al.* Inhibition of scavenger receptor a expression treated with PMA by the inhibitor of tyrosine protein kinase genistein. *Acta Biochem Biophys Sin.* 2001, **33** (1): 142 ~ 146
- 8 Nakamura T, Hinagata J, Tanaka T, *et al.* HSP90, HSP70, and GAPDH directly interact with the cytoplasmic domain of macrophage scavenger receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002, **290** (2): 858 ~ 864
- 9 Miki S, Tsukada S, Nakamura Y, *et al.* Functional and possible physical association of scavenger receptor with cytoplasmic tyrosine kinase Lyn in monocytic THP-1-derived macrophages. *FEBS Lett.* 1996, **399** (3): 241 ~ 244
- 10 Pearse B M F, Robinson M S. Clathrin, adaptors, and sorting. *Annu Rev Cell Biol.* 1990, **6**: 151 ~ 171
- 11 Morimoto K, Wada Y, Hinagata J, *et al.* VXFD in the cytoplasmic domain of macrophage scavenger receptors mediates their efficient internalization and cell-surface expression. *Biol Pharm Bull.* 1999, (10): 1022 ~ 1026
- 12 Letourneur F, Klausner R D. A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell.* 1992, **69** (7): 1143 ~ 1157
- 13 Backer J M, Schoelson S E, Weiss M A, *et al.* The insulin receptor juxtamembrane region contains two independent tyrosine/beta-turn internalization signals. *J Cell Biol.* 1992, **118** (4): 831 ~ 839

The Role of Staurosporine in Mediating The Function of Cytoplasmic Domain-truncated Scavenger Receptor *

GUAN Xiao-Xiang^{1,2)}, Chen Qi¹⁾ **, Fan Le-Ming¹⁾

(¹⁾ Atherosclerosis Research Center, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China;

²⁾ Department of Oncology, General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002, China)

Abstract The class A scavenger receptor (SR-A) is a glycoprotein expressed on the cell surface of macrophages that mediates internalization of chemically modified lipoprotein. It was reported that the receptor internalization required the presence of internalization signal motif and the rate of receptor internalization was governed by the pattern of receptor phosphorylation induced by the ligands. However, the role of the cytoplasmic domain played in the receptor-mediated endocytosis is not fully characterized. Here the changes in internalization process of the receptor were reported when the whole cytoplasmic domain sequence (150 base pairs) was truncated. Both the full length and truncated were recombined into pCDNA3.1/HisB vector and were then transfected to CHO cells separately. Measurement of uptake of DiI-AcLDL by transfected cells with FACS showed that the bind and uptake of the ligand in full length SR-A was higher than that of truncated receptor (1.3 fold increase). After incubated with DiI-acetyl-LDL (DiI-AcLDL), the full length SR-A-transfected cells showed a diffuse distribution of the DiI-AcLDL in cytoplasm as well as in cell membrane when monitored under laser confocal microscopy. But in the truncated SR-A-transfected CHO cells, DiI-AcLDL mostly distributes at the cell surface only. In order to elucidate the role of phosphorylation played in mediating the function of cytoplasmic domain of SR-A, transfected CHO cells were preincubated with Staurosporine for 1 h at the concentration of 0.4 $\mu\text{mol/L}$. Then the cells were refed with medium containing DiI-AcLDL at the concentration of 10 mg/L at 37°C for 2 h, the DiI specially associated to cells was measured by spectrofluorometer. The result indicated that staurosporine did not changed DiI-AcLDL bound and untaken by truncated receptor, which was different from the full length SR-A that increased obviously. The research here demonstrated that cytoplasmic domain regulate the receptor activity of SR-A, in which the phosphorylation or dephosphorylation of the cytoplasmic domain might play a key role, the MSR-A cytoplasmic domain may be indispensable in mediating binding and uptaking as well as internalization.

Key words scavenger receptor, cytoplasmic domain, phosphorylation, protein kinase C inhibitor

* This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (TG200056910) and The Applied Basic Research Programs of Science and Technology Commission Foundation of Jiangsu Province (BK2001113).

** Corresponding author. Tel: 86-25-86662610, Fax: 86-25-86508960, E-mail: qichen@njmu.edu.cn

Received: February 23, 2004 Accepted: April 7, 2004