

中图分类号: Q74; R99 文献标识码: A 文章编号: 1002-3127(2021)03-0241-06

• 综述 •

细胞色素 P450 原核功能表达系统概述

周小洁¹, 邱星辉², 曾晓芃¹

(1. 北京市疾病预防控制中心/北京市预防医学研究中心, 北京 100013;

2. 中国科学院动物研究所, 北京 100101)

关键词: 细胞色素 P450; 原核表达系统; 序列修饰; 共表达; 细胞色素 P450 还原酶

DOI:10.16421/j.cnki.1002-3127.2021.03.012

1955 年 Axelrod^[1] 在鼠肝内质网上发现存在一些能参与氧化代谢的酶系, 并且以还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 作为还原剂。Omura 和 Sato^[2] 证实该酶系被还原后能与一氧化碳 (CO) 结合, 并在 450 nm 处有特征吸收峰 (Soret 吸收峰), 并命名为细胞色素 P450 (Cytochrome P450, CYP450), 但变性的细胞色素 P450 与 CO 的结合光谱峰不在 450 nm 而在 420 nm 处, CO 差示光谱是 P450 定性和定量分析的重要方法。

细胞色素 P450 是一类由含铁血红素蛋白组成的超家族单加氧酶, 广泛存在于古细菌、病毒、原虫和高等动植物等生命体中, 现已命名的 P450 基因已超过 4 万个^[3]。对于高等哺乳动物, 细胞色素 P450 不仅参与内源性化合物如类固醇、脂肪酸、激素、生物胺、维生素以及白三烯等的生物合成与代谢, 还催化多样的异生物质代谢, 如药物、致癌物、诱变剂、植物次生物质与环境中的其他污染物等, 因此细胞色素 P450 被认为是功能多样的生物催化剂^[4]。

药物动力学与毒理学研究需要大量具有功能活性的 P450, 传统的体外药物代谢研究多采用肝微粒体或肝细胞培养, 但是肝组织中含有多种形式的 P450, 利用蛋白质分离纯化技术得到单一 P450 受到来源短缺、结构相似和易于变性等因素的限制。另外, 由于 P450 的基因多态性, 从某一个体组织得到的结果并不能真实反映其他个体或群体中的活性^[5]。随着分子生物学技术的发展, 异源表达 P450 活性成为研究其功能活性的有效手段。除了主要在药理及毒理学领域应用, P450 异源表达系统还被应用到其他多领域研究中, 如昆虫抗药性与植物次生物代谢等。在真核与原核等不同的 P450 异源表达系统中, 各种方法均有优

势与不足, 本文在系统比较几种主要 P450 异源表达系统的基础上, 重点对大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 原核表达系统中影响 P450 异源表达的各因素进行分析, 以期对该系统的应用提供一定的基础数据支持。

1 细胞色素 P450 异源表达系统的比较与应用

P450 在生物体分布的广泛性、种类的多样性、含量的不确定性和活性的不稳定性, 使得从生物组织中分离纯化单一 P450 进行相关研究较为困难, 由此推动了 P450 异源表达系统的研究应用。目前, 已有多种异源表达系统成功表达出 P450 的功能活性, 包括酵母、哺乳动物细胞 (如原淋巴细胞、COS 细胞、CHO 细胞、HepG2 细胞等)、杆状病毒介导的昆虫细胞与大肠杆菌 *E. coli* 等表达系统^[6-9]。酵母表达系统具有真核生物的内质网膜结构, 通过基因工程改造后可自身表达细胞色素 P450 还原酶 (cytochrome P450 reductase, CPR) 而无需外源引入表达, 但有重组活性不稳定的可能。哺乳动物细胞在表达自身 P450 时, 最接近于生物体真实的“生理环境”, 如通过肝细胞培养来表达人 P450 时能提供膜环境和其他辅助因素, 但肝外组织的 P450 在其中表达可能出现问题。早期所使用的哺乳动物细胞系统表达 P450 水平很低, 用正常的光谱学方法无法检测其含量, 后来该系统逐步优化使得表达水平不断提升; 然而, 该方法主要局限于较低水平表达哺乳动物 P450, 且对技术要求较高, 不适于大规模培养。杆状病毒介导的 Sf9 细胞 (来自草地夜蛾 *Spodoptera frugiperda*) 表达系统已成为表达大量膜结合且具有催化活性 P450 的有效手段, 培养过程中血红素 (heme) 的加入可保证足够的血红素蛋白合成, 该系统无需对 P450 的基因序列进行修饰, 也没

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (31501901); 首都卫生发展科研专项 (2016-4-011)

作者简介: 周小洁, 博士, 副研究员, 研究方向: 毒理学与媒介生物应用基础研究。

通讯作者: 曾晓芃, 博士, 主任技师, 研究方向: 病媒生物防制。

有内源性 P450 干扰,但由于不含 P450 还原酶基因 CPR,因此需要与 P450 进行共表达,同时该系统也存在对血红素吸收效率较低的问题。

在所有表达系统中,大肠杆菌表达系统在外源蛋白质表达方面表现出独有的特点而受到广泛关注。已有大量的细胞色素 P450 在该系统中得到成功表达,该系统的优势在于技术要求较低、操作简便、成本低廉、易于吸收血红素、背景 P450 干扰小,以及相对容易获得较高表达水平等,可供选择的载体与表达菌株较多,易于对序列进行加工修饰;同时,该系统也适合大规模培养,为开展药物代谢以及蛋白结构测定等研究提供足够蛋白^[5]。由于大肠杆菌作为原核生物的固有特性,该系统面临的最大问题是由于缺乏真核生物特有的膜系统而无法满

P450 等膜蛋白的定位要求,也不能对蛋白进行翻译后或共翻译修饰或正确折叠,同时缺乏内源性的 P450 还原酶与其他成分来参与 P450 酶系的电子传递。尽管存在上述不足,研究人员通过多种手段来解决上述问题,如对序列 N 端进行适当修饰、与细胞色素 P450 还原酶共表达或融合表达、与分子伴侣共表达、利用细菌信号肽进行细胞周质表达等,为 P450 在药理学、毒理学、生物化学以及生物物理学方面的研究提供支持^[9-12]。

对于不同 P450,对表达系统的选择不仅要考虑上述各因素,还取决于表达产物与宿主细胞的兼容性、蛋白的稳定性以及与内源性或/和超表达的氧化还原搭档的偶联效率等。表 1 从不同角度对上述几个 P450 异源表达系统的优势与局限性进行比较分析。

表 1 细胞色素 P450 不同异源表达系统特点比较分析^[7,13]

项目	酵母	哺乳动物细胞	昆虫细胞 <i>Sf 9</i>	大肠杆菌
表达水平	中等(1~3 nmol/L)	中等偏低(20~100 pmol/mg 蛋白),有时很难检测到	较高(74~132 nmol/L)	高(150~500 nmol/L)
技术要求	低	高	较高	低
培养成本	相对较低	高	高	低
大规模培养	适合	不适合	不适合	适合
辅助因子(如血红素)添加	不需要	不需要	需添加外源血红素	需添加血红素的前体 δ-ALA
内源 P450 活性的干扰	存在	存在	存在	不存在
对 CPR 的要求	利用内源 CPR,但效率可能较低	利用内源性 CPR	必须共表达 CPR	必须共表达 CPR,有时可能需要细胞色素 b5 存在
对序列 N 端修饰	不需要(适当修饰可增加表达量)	不需要	不需要	绝大部分需要
翻译后修饰	存在	存在	存在	不存在
建立可靠系统的时间*	约 3 个月	约 6 个月	约 2~3 个月	约 3 个月
培养周期	几天~1 周	数周	几天~1 周	约 1~2 d

注: * 该时间是指指示性的,仅代表了不同研究者的个人经验,包括对目标 P450 进行基因克隆、系统构建与稳定表达的时间。

2 细胞色素 P450 在大肠杆菌 *E. coli* 中的异源表达

P450 的结构与功能是药理学与毒理学领域的重要研究内容,例如通过大肠杆菌 P450 重组表达系统研究药物的代谢途径,预测其生物利用率、毒性以及药物之间的互作效应,还可以利用定点突变来分析 P450 基因多态性与功能活性的关系。

随着 *E. coli* 原核表达系统的不断优化改进,针对表达 P450 的不足,从过去单纯的诱导表达达到采用多种策略优化表达效果,使得其成为研究 P450 结构功能的重要手段。这些技术优化包括氨基端序列修饰、分子伴侣共表达、载体选择、人工合成基因优化密码子频率等。考虑到影响 P450 表达量与细胞定位的诸多因素,难免会出现表达水平偏低的情况。下文对 P450

原核表达过程的主要影响因素和部分技术参数进行分析汇总。

2.1 表达载体与 *E. coli* 菌株的选择

自 Barnes 等^[9](Waterman 研究小组)于 1991 年首次用大肠杆菌成功表达牛 P45017A1,其采用的 pCW Ori+ 表达载体与菌株已被广泛推广使用。pCW Ori+ 是 pHSe5 质粒的衍生物,碱基数约 5 000bp,具有氨苄青霉素抗性,其特点是含有两个串联的 *tac* 强启动子由 *Lac* 和 *trp* 启动子人工构建的杂合启动子,启动能力强于 *Lac* 和 *trp*,可被异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导,启动子的下游是 Nde I 限制性酶切位点(CATATG),而该酶切位点恰好含有翻译起始密码子 ATG,可保证目的基因正确的插入方向。该质粒还携带 *lacIq* 基因,能有效阻止重

组质粒在 IPTG 加入之前的渗漏表达,从而实现严谨的诱导调控。此外,该载体还含有一段强 *trpA* 转录终止序列、M13 噬菌体的 DNA 复制起点和较丰富的多克隆位点。上述特点是其被广泛应用的主要原因。对人 P450 进行原核表达时,常使用的 *E. coli* 菌株是 JM109 和 DH5 α ,另外还有许多菌株也已成功用于 P450 表达,如 MV1304、XL1-Blue 和 C41 (DE3) 等^[14-16]。总之,在实际表达过程中可根据目标 P450 序列特征与研究目的,必要时通过预试验筛选来确定最佳表达载体和菌株^[5]。

2.2 对 P450 基因编码序列的修饰策略 通过对编码蛋白的基因序列进行修饰可影响其在原核表达系统中的识别性。在 P450 原核表达系统中主要有两种序列修饰策略,最常见的是对 P450 氨基端(N 端)序列进行突变以便表达产物定位于原生质膜,从而获得膜结合状态的活性 P450,这也是本文关注的重点^[10]。另外一种策略是对信号肽序列截短/修饰使表达产物定位于细胞质,进而获得可溶形式的 P450,主要用于晶体结构的解析^[15]。

大肠杆菌的原核生物特性在为 P450 表达带来许多便利的同时,表现出其不足,如与真核生物不同的密码子偏好以及对转录调控区域和目的基因 5 末端碱基的特殊要求(AT 含量不能太高,否则形成二级结构)。所以,将真核生物 P450 的天然 cDNA 序列直接在大肠杆菌中进行表达,表达产物含量可能较低。此外,另外一个必要因素就是 P450 表达产物对膜系统的依赖性,要求表达产物依靠 NH₂-端的疏水性氨基酸序列高效锚定于细胞质膜上,否则会导致表达产物聚集变性。基于上述原因,各研究中对 P450 原核表达系统的优化主要集中在对其编码区 NH₂-端的碱基进行修饰替换,目的是提高 *E. coli* 对其翻译效率并有效锚定于生物膜表面。所有 NH₂-端修饰都基于一个假设,即 P450 蛋白 NH₂-端的疏水性序列仅作为与膜结合的锚定序列发挥作用,而在催化反应、底物结合以及与细胞色素 P450 还原酶 CPR 或细胞色素 b5 偶联的过程中并不发挥直接作用,不会改变重组 P450 的酶学特征。此外,P450 蛋白的 NH₂-端疏水性序列对整体在膜上的定位起主要作用,但去除该区域后的表达产物(如 CYP2E1)仍有一部分能定位在膜上,这表明该蛋白的其他区域(如 F-G 螺旋)也发挥跨膜结合的作用。总之,对 P450 基因 cDNA 的 NH₂-端进行修饰替换已成为 *E. coli* 表达 P450 过程中不可或缺的步骤,也是表达成功与否的关键环节。

Barnes 等^[9]起初将牛 CYP17A1 原始的 cDNA 序列载入很多不同的表达载体均未成功,在对 CYP17A1 的 NH₂-端序列进行分析后发现这一区域对 *E. coli* 表达外源蛋白水平有重要作用,因为 *E. coli* 的 mRNA 在该区域富含腺嘌呤核苷酸(A)和尿嘧啶核苷酸(U),于是基于 PCR 对外源 P450 的 cDNA 序列前 7 个密码子进行合理变换(即 17- α 策略),具体是将第 2 个密码子 TGG(色氨酸 Trp)变成 *E. coli* 在表达 *lacZ* 基因时在该位置较为偏爱的 GCT(丙氨酸 Ala)密码子,将第 4、5 位密码子突变为 TTA(沉默突变)。此外,分别将第 6、7 位密码子的最后一个核苷酸沉默突变为腺嘌呤(A)和胸腺嘧啶(T),以此增加 AT 含量从而减少稀有密码子使用率和 mRNA 形成二级结构(可能阻止蛋白翻译)的可能。通过上述碱基的修饰,CYP17A1 的氨基酸序列由 MWLLAVF 变成 MALLAVF,其表达水平提高至 16 mg/L 培养基,而且绝大部分被整合到膜上。在加入鼠肝 CPR 提取物后,对不同底物均表现出很强的催化活性(如 17- α 羟化酶和 17,20-裂解酶活性),这表明对 NH₂-端序列的合理修饰提高了 P450 表达水平,但并未影响其催化活性^[9]。随后,许多研究者开始采用 17- α 策略,将目的 P450 蛋白的 NH₂-端疏水性序列与 CYP17A1 修饰后的前 8-9 个氨基酸序列进行比对,然后对目的基因序列进行相应的修饰达到相似序列。中国科学院动物研究所利用 17- α 策略对多个物种来源的 P450 进行了成功表达,如 Yang 等^[17]成功表达鸡 P450(CYP1A4)对模式底物及药物喹烯酮和卡巴氧表现出代谢活性,Yuan 等^[18]成功表达鸡 P450(CYP3A37)对 T-2 毒素的羟基化活性,Liu 等^[19]成功表达棉铃虫 P450(CYP9A12、CYP9A14 和 CYP9A17)对模式底物的氧脱甲基活性(MROD/BROD/EROD),Tian 等^[20-21]报道了棉铃虫 CYP6B6、CYP9A12、CYP9A14 和 CYP9A17 原核表达产物分别对顺式氟戊菊酯(esfenvalerate)、辣椒素(capsaicin)等表现出羟基化与脱氢活性。例外的是,Kim 等^[22](2008)使用 *E. coli* 系统成功表达了没有进行任何修饰和采用 17- α 策略修饰的两种形式的 CYP1A2,发现在优化条件(32 °C 培养)下,前者表达量达到 650 nmol/L 培养基,与后者相当,同时第二位密码子的替换与否对表达水平没有实质影响。综合分析相关研究对 P450 序列 NH₂-端的修饰策略可知,有小部分序列未经修饰也可以成功表达,但 17- α 策略普遍对 P450 的原核表达起到了根本性的改进。

由于不同 P450 的 NH₂-端序列需进行不同的截短

与突变, 17- α 策略缺乏一个简单通用的修饰方法, 且改变了蛋白的原始序列。针对这一问题, Pritchard 等^[10]报道了一种改进的策略, 将 P450 的 NH₂-端与细菌信号肽 ompA 进行融合(称其为 ompA 策略), 而对 P450 的原始序列不作修改, 之前已有研究采用该方法成功表达了人载脂蛋白、鼠细胞色素 P450 还原酶 CPR 等膜蛋白^[23-24]。细菌信号肽可将翻译的新生 P450 多肽链引导至细菌内膜, 然后信号肽被切除从而留下成熟的 P450 蛋白。该方法与 17- α 策略相比主要有以下几个优点: 首先, 无需对 P450 的 cDNA 序列进行优化改变; 其次, 前导序列(即信号肽)固有的靶向于膜的特性有助于提高膜组分制备过程中 P450 的活性回收率; 第三, 该策略降低了核糖体结合位点和起始密码子周围形成二级结构的可能性, 增加序列的“可翻译性”。最后, *E. coli* 表达系统翻译停止的主要原因是目的基因的前 25~30 个密码子中含有稀有密码子, 而使用融合天然信号肽的策略也降低了稀有密码子造成的不利影响。Pritchard 等^[10]分别将 *pelB* 和 *ompA* 两种信号肽融合到 CYP3A4 进行表达, 发现 *ompA*-CYP3A4 表达水平更高(与其在杆状病毒介导的 *Sf9* 昆虫细胞中的表达水平相当, 高于人肝微粒体中 CYP3A4 含量)而且与 17- α 策略表达产物相比, 在膜组分制备过程中 P450 活性回收效率更高。然而, 在该研究中融合表达产物 *ompA*-CYP3A4 的信号肽并未被有效切除(虽然对活性没有显著影响), 原因可能是信号肽酶的可利用性受到限制。为此, 研究组提出了改进后的 *ompA*+2 策略, 即在 *ompA* 信号肽与 P450 序列之间添加丙氨酸和脯氨酸(Ala-Pro)两个氨基酸, 可提高对信号肽的切割效率。

2.3 细胞色素 P450 还原酶 CPR 的获得方式 P450 活性重组体系中必须有氧化还原搭档 CPR(负责电子转移)的存在。有 2 种途径可以获得, 第一种途径是在活性重组体系中加入可与 P450 发生互作的外源 CPR(必要时使用超声波辅助)。Barnes 等^[9](1991)在 CYP17A1 表达产物中利用 *E. coli* 电子转移系统得到重组活性, 但低于与鼠 CPR 重组活性, 表明不同来源的 CPR 具有很强的功能互换性。第二种途径是将 CPR 与 P450 两个目标基因融合表达或利用双顺反子系统共表达。Yun 等^[5]报道将牛 CYP17A1 与鼠 CPR 成功融合表达, 但该方法使用较少, 可能因为对原始序列进行了较大程度的改变且活性不能获得明显改善^[11, 13]。双顺反子表达系统包括两种形式, 即双质粒和单一质粒, 前者是利用两个相容质粒分别携带 P450

与 CPR 进行共表达, 后者是将两个目的基因连接到同一载体, 共享同一启动子或分别利用各自的启动子^[10, 25-27]。Pritchard 等^[25]认为利用单一质粒共表达系统在更换目的基因序列时会出现很多不便, 故利用分别携带人 CYP2D6 和 CPR 基因的 pCWOri+(氨苄青霉素抗性)和 pACYC184(氯霉素抗性)双质粒在 *E. coli* 进行共表达, 无论 CYP2D6 的表达水平、重组活性还是 CPR 对细胞色素 c 活性都取得成功。Tian 等^[20-21]利用上述方法构建了棉铃虫 CYP6B6、CYP9A12、CYP9A14 和 CYP9A17 基因与 CPR 基因的原核双顺反子表达系统。

2.4 对其他辅助因子的需求 细胞色素 P450 酶系中还需有一些其他辅助因子的存在, 如负责提供电子的 NADPH 以及与 P450 共价结合的血红素分子; 还有一些研究中为了尽可能模拟真实的生物体环境并改善酶活性, 在重组体系中加入细胞色素 b5 和几种类型磷脂的混合物^[5]; 使用分子伴侣(如 Hsp40 和 GroES/GroEL)也可帮助 P450 构象的折叠^[17]。在此, 仅对 NADPH 和血红素两个必需因素进行论述。在原核表达系统中, 一般通过 NADPH 再生系统或直接添加 NADPH 来为 CPR 提供必需的还原力。然而, 有研究用 P450(CYP2D6 与 CYP3A4)原核表达产物即完整的 *E. coli* 细胞直接进行底物活性测定时发现, 即使反应体系中不添加 NADPH 也可以达到用膜组分(加入外源 NADPH)测定的活性水平, 这表明在初始培养条件下, 底物的摄入与辅助因子的可利用率均不会成为 *E. coli* 中 P450 表达产物活性的限制因素, 而一旦分离出膜组分, 则失去了辅助因子, 就需要额外添加^[25]。因此, 直接利用 *E. coli* 细胞进行活性研究也有望成为一种生物反应器。在 P450 功能体系中, 血红素是不可或缺的组分, 任何体系中都必须保证其与 P450 有效结合。在 *E. coli* 表达系统中, 通常在培养基中加入血红素的前体 δ -氨基乙酰丙酸(δ -ALA), 它是合成血红素必不可少的前体物质。尽管在不添加外源 δ -ALA 的情况下 CYP2D6 表达产物也有典型的 P450 光谱活性, 但大部分研究中, 在反应体系中添加 δ -ALA 用于提高 P450 表达量^[25]。

2.5 培养条件 在 P450 原核表达过程中, 通常将含有目的载体的单克隆在含有抗生素的液体 LB 培养基中过夜培养(37 °C), 然后按一定比例转入 Terrific Broth(TB)培养基中继续培养(28~32 °C), TB 培养基中含有 δ -ALA、维生素 B₁₂、微量元素、抗生素等, 待培养基光密度 A₆₀₀ 达到 0.7~1.0 时, 加入 IPTG 诱导, 也

有个别研究起初就在 TB 培养基中加入 IPTG^[11]。诱导表达阶段的培养温度对 P450 的生成至关重要,一般要低于 32 °C,温度太高会导致蛋白合成速度太快,构象折叠错误,并可能形成包涵体。因此,低温诱导可以保证有足够的时间使蛋白质正确折叠,并充分摄入血红素分子。当然,也有研究在 37 °C 诱导表达 P450(如 CYP1A2, CYP3A4),结果与 28 °C 诱导水平差异无统计学意义^[5]。培养基的通气状况也是经常被忽视的问题,通风不好会影响菌体生长和蛋白表达。所以,培养基体积不能超过培养容器容积的 1/5,而且随着培养规模成比例增大,也会出现表达量下降的情况。此外,培养基中的抗生素(如氯霉素)在提供选择压力并防止杂菌生长的同时,还能起到类似于冷休克的作用,能提高 P450 表达水平^[28]。

3 结束语

自从第一次将牛 CYP17A1 在 *E. coli* 中成功表达后,近年来在 P450 原核表达系统与蛋白质工程方面已经取得了很大的进展,对相关学科产生了良好的促进作用,加深对 P450 结构与功能关系以及 P450 与底物结合机理的认识,而且有助于药物代谢的预测,从而进行合理的药物设计(如抗癌药物)。P450 代谢活性的研究对毒理学、药理学以及药物代谢动力学也产生重要影响,该系统在遗传毒性试验研究中能克服其他表达系统的不足之处,可用于药物非临床安全性评价,其结果可直接运用于指导药物临床试验等相关应用工作。总之,对该系统的合理应用与发展有助于相关领域的基础与应用性研究工作。

参考文献

- [1] Axelrod J. The enzymatic demethylation of ephedrine [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1955, 114(4): 430-438.
- [2] Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes [J]. *J Biol Chem*, 1964, 22(7): 2730-2738.
- [3] Nelson DR. Cytochrome P450 diversity in the tree of life [J]. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 2018, 1866(1): 141-154.
- [4] Gillam EM. Extending the capabilities of nature's most versatile catalysts: directed evolution of mammalian xenobiotic-metabolizing P450s [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2007, 464(2): 176-186.
- [5] Yun CH, Yim SK, Kim DH, et al. Functional expression of human cytochrome P450 enzymes in *Escherichia coli* [J]. *Curr Drug Metab*, 2006, 7(4): 411-429.
- [6] Helvig C, Tijet N, Feyereisen R, et al. *Drosophila melanogaster* CYP6A8, an insect P450 that catalyzes lauric acid (ω -1)-hydroxylation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 325(4): 1495-1502.
- [7] Purnapatre K, Khattar SK, Saini KS. Cytochrome P450s in the development of target-based anticancer drugs [J]. *Cancer Lett*, 2008, 259(1): 1-15.
- [8] Chiu TL, Wen Z, Rupasinghe SG, et al. Comparative molecular modeling of *Anopheles gambiae* CYP6Z1, a mosquito P450 capable of metabolizing DDT [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(26): 8855-8860.
- [9] Barnes HJ, Arlotto MP, Waterman MR. Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 α -hydroxylase in *Escherichia coli* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(13): 5597-5601.
- [10] Pritchard MP, Ossetian R, Li DN, et al. A general strategy for the expression of recombinant human cytochrome P450s in *Escherichia coli* using bacterial signal peptides: expression of CYP3A4, CYP2A6 and CYP2E1 [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1997, 345(2): 342-354.
- [11] Deeni YY, Paine MJ, Ayrton AD, et al. Expression, purification, and biochemical characterization of a human cytochrome P450 CYP2D6-NADPH cytochrome P450 reductase fusion protein [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2001, 396(1): 16-24.
- [12] Mogk A, Mayer MP, Deuerling E. Mechanisms of protein folding: molecular chaperones and their application in biotechnology [J]. *Chembiochem*, 2002, 3(9): 807-814.
- [13] Gillam EM. Human cytochrome P450 enzymes expressed in bacteria: reagents to probe molecular interactions in toxicology [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1998, 25(11): 877-886.
- [14] Pernecky SJ, Larson JR, Philpot RM, et al. Expression of truncated forms of liver microsomal P450 cytochromes 2B4 and 2E1 in *Escherichia coli*: influence of NH₂-terminal region on localization in cytosol and membranes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(7): 2651-2655.
- [15] Li YC, Chiang JY. The expression of a catalytically active cholesterol 7 α -hydroxylase cytochrome P450 in *Escherichia coli* [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(29): 19186-19191.
- [16] Miroux B, Walker JE. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels [J]. *J Mol Biol*, 1996, 260(3): 289-298.

(下转第 250 页)

- [31] Zhang J , Yao T , Wang Y , et al. Long noncoding RNA MEG3 is downregulated in cervical cancer and affects cell proliferation and apoptosis by regulating miR-21 [J]. *Cancer Biolo Ther* , 2016 , 17(1) : 104-113.
- [32] Zhang Z , Weaver DL , Olsen D , et al. Long non-coding RNA chromogenic in situ hybridisation signal pattern correlation with breast tumour pathology [J]. *J Clin Pathol* , 2016 , 69(1) : 76-81.
- [33] Zhu Y , Yang T , Duan J , et al. MALAT1/miR-15b-5p/MAPK1 mediates endothelial progenitor cells autophagy and affects coronary atherosclerotic heart disease via mTOR signaling pathway [J]. *Aging* , 2019 , 11(4) : 1089.
- [34] Hofmann P , Sommer J , Theodorou K , et al. Long non-coding RNA H19 regulates endothelial cell aging via inhibition of STAT3 signalling [J]. *Cardiovas Res* , 2019 , 115(1) : 230-242.
- [35] Yao J , Shi Z , Ma X , et al. lncRNA GAS5/miR-223/NAMPT axis modulates the cell proliferation and senescence of endothelial progenitor cells through PI3K/AKT signaling [J]. *J Cell Biochem* , 2019 , 120(9) : 14518-14530.
- [36] Tan P , Guo YH , Zhan JK , et al. LncRNA-ANRIL inhibits cell senescence of vascular smooth muscle cells by regulating miR-181a/Sirt1 [J]. *Biochem Cell Biol* , 2019 , 97(5) : 571-580.
- [37] Graham SH , Liu H. Life and death in the trash heap: The ubiquitin proteasome pathway and UCHL1 in brain aging , neurodegenerative disease and cerebral Ischemia [J]. *Ageing Res Rev* , 2017 , 34: 30-38.
- [38] Wang X , Zhang M , Liu H. LncRNA17A regulates autophagy and apoptosis of SH-SY5Y cell line as an in vitro model for Alzheimer's disease [J]. *Biosci Biotech Bioch* , 2019 , 83(4) : 609-621.
- [39] Zhao Y , Zhang Y , Zhang L , et al. The potential markers of circulating microRNAs and long non-coding RNAs in Alzheimer's Disease [J]. *Aging Dis* , 2019 , 10(6) : 1293-1301.

(收稿日期: 2020-01-22)

(上接第 245 页)

- [17] Yang J , Liu Z , Li M , et al. Hydroxylation of quinocetone and carbadox is mediated by CYP1As in the chicken (*Gallus gallus*) [J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* , 2013 , 158(2) : 84-90.
- [18] Yuan Y , Zhou X , Yang J , et al. T-2 toxin is hydroxylated by chicken CYP3A37 [J]. *Food Chem Toxicol* , 2013 , 62: 622-627.
- [19] Liu D , Tian K , Yuan Y , et al. Prokaryotic functional expression and activity comparison of three CYP9A genes from the polyphagous pest *Helicoverpa armigera* [J]. *Bull Entomol Res* , 2018 , 108(1) : 77-83.
- [20] Tian K , Liu D , Yuan Y , et al. CYP6B6 is involved in esfenvalerate detoxification in the polyphagous lepidopteran pest , *Helicoverpa armigera* [J]. *Pestic Biochem Physiol* , 2017 , 138: 51-56.
- [21] Tian K , Zhu J , Li M , et al. Capsaicin is efficiently transformed by multiple cytochrome P450s from capsicum fruit-feeding *Helicoverpa armigera* [J]. *Pestic Biochem Physiol* , 2019 , 156: 145-151.
- [22] Kim DH , Kim KH , Isin EM , et al. Heterologous expression and characterization of wild-type human cytochrome P450 1A2 without conventional N-terminal modification in *Escherichia coli* [J]. *Protein Expr Purif* , 2008 , 57(2) : 188-200.
- [23] Monteilhet C , Lachacinski N , Aggerbeck LP. Cytoplasmic and periplasmic production of human apolipoprotein E in *Escherichia coli* using natural and bacterial signal peptides [J]. *Gene* , 1993 , 125(2) : 223-228.
- [24] Shen AL , Kasper CB. Role of acidic residues in the interaction of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase with cytochrome P450 and cytochrome c [J]. *J Biol Chem* , 1995 , 270(46) : 27475-27480.
- [25] Pritchard MP , Glancey MJ , Blake JA , et al. Functional co-expression of CYP2D6 and human NADPH-cytochrome P450 reductase in *Escherichia coli* [J]. *Pharmacogenetics* , 1998 , 8(1) : 33-42.
- [26] Dong J , Porter TD. Coexpression of mammalian cytochrome P450 and reductase in *Escherichia coli* [J]. *Arch Biochem Biophys* , 1996 , 327(2) : 254-259.
- [27] Blake JA , Pritchard M , Ding S , et al. Coexpression of a human P450 (CYP3A4) and P450 reductase generates a highly functional monooxygenase system in *Escherichia coli* [J]. *FEBS Lett* , 1996 , 397(2-3) : 210-214.
- [28] Kagawa N , Hori H , Waterman MR , et al. Characterization of stable human aromatase expressed in *E. coli* [J]. *Steroids* , 2004 , 69(4) : 235-243.

(收稿日期: 2020-10-26)