茶树菇 *Agrocybe aegerita* 新泛素偶联酶蛋白表达及抗肿瘤活性研究

梁一[1]，刘洪洪[2]，关鑫[1]，孙慧[2]
（1.广东医学院医学检验学院，广东东莞 523808）
（2.武汉大学生命科学学院病毒学国家重点实验室，湖北武汉 430072）

摘要：大型真菌茶树菇活性蛋白组分 Yt 在动物模型中被发现具有抗肿瘤及免疫调节活性。为研究其蛋白组分，构建新鲜蘑菇子实体 cDNA 文库，对 cDNA 序列进行测序筛选，获得新型真菌泛素偶联酶（Ub-conjugating enzyme，UBC）的 cDNA 序列（GenBank 登录代码：JQ362395），分析其含有 UBC 家族的保守残基。使用原核表达 pET 系统表达和纯化重组 UBC 蛋白，得率是 10 mg/L 大肠杆菌培养液。在细胞培养中加入重组 UBC 蛋白将显著改变细胞形态，通过流式细胞仪发现 UBC（1.8、3.6、7.2 μM）均能诱导 HeLa 细胞凋亡，Annexin V+/PI-百分比由对照组的 1.4%上调至 10.7%、15.8%和 20.3%，呈浓度依赖性。本文是首次报道真菌 UBC 具有抗肿瘤活性。该结果暗示，真菌泛素系统成员可能通过改变细胞基本生理功能，成为潜在的候选药物，值得探讨。

关键词：大型真菌；凋亡活性；真菌泛素偶联酶
文章篇号：1673-9078(2015)12-1-5 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.12.001

Expression and Antitumor Activity of a Novel Ubiquitin Conjugating Enzyme from the Medicinal Fungus *Agrocybe aegerita*

LIANG Yi[1], LIU Hong-hong[2], GUAN Xin[1], SUN Hui[2]
(1.Department of Clinical Immunology, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China)
(2.State Key Laboratory of Virology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: The active protein component Yt from macrofungi Agrocybe aegerita has been found to have antitumor and immune regulation activity. For the investigation of the proteins, a cDNA library of the Agrocybe aegerita fruiting body was constructed and screened. The cDNA of a novel fungal Ub-conjugating enzyme (UBC) was identified (Genbank accession code: JQ362395), and sequence analysis revealed that it contained the conserved residues and belonged to the UBC family. Recombinant UBC was expressed using the pET system and purified, and obtained 10 mg from 1 L E coli. culture media. Exogenously applied UBC (1.8, 3.6 and 7.2 μM) in cell cultures altered HeLa cell morphology and induced cell apoptosis determined by flow cytometry, and the percentage of AnnexinV+/PI- cells was increased from 1.4% in control to 10.7%, 15.8% and 20.3%, which was concentration dependent. This is the first report on the effects of a fungal UBC on cancer cells, which suggests that the members of the fungal ubiquitin system might alter fundamental cellular processes and require further investigation.

Key words: macrofungi; apoptosis activity; fungal Ubiquitin Conjugating enzyme.

大型真菌因其优异和独特的药用价值有着超过五千年的历史[1~2]。从大型真菌中已分离出多种生物活性物质，包括多糖，蛋白质，微量元素等。

收稿日期：2015-03-09
基金项目：国家自然科学基金（81102850）；广东省卫生厅基金（A2011434）；广东省教育厅育苗工程（LYM11070）；东莞市科技局项目（2011108102049）；湛江市科技攻关项目（2011C3109015）
作者简介：梁一（1981-），女，博士，讲师，药用真菌抗肿瘤、抗病毒活性成分研究；刘洪洪和关鑫为共同第一作者
通讯作者：孙慧（1974-），女，博士，教授，药用真菌抗肿瘤、抗病毒活性成分研究

传统研究认为，多糖是大型真菌主要的抗肿瘤活性组分，通过调节免疫来抑制肿瘤。而目前分离的真菌蛋白大多也表现出极强的抗肿瘤活性（nM 级），且作用机理各异[3]。在之前的研究中，本小组发现分离自茶树菇 *Agrocybe aegerita* 的蛋白质组分 Yt 具有显著地消除肿瘤和免疫调节作用[4~5]，其中茶树菇凝集素 AAL[6]、凝集素 AAL-2[7]、脱氧核糖核酸酶已被纯化并深入研究。但与庞大的资源宝库相比研究还远远不足，从大型真菌中分离新的抗肿瘤药理成分，阐明其作用机理意义重大。

真菌的繁殖特点（有性或无性繁殖，菌丝的异宗

结合，不同遗传背景的菌丝纽结成子实体等），使得其基因克隆非常困难。因此，本文通过构建 cDNA 文库结合表达序列标签分析快速获得大量基因信息，包括泛素偶联酶基因、SUMO 等。泛素-蛋白酶体系统（ubiquitin-proteasome system，UPS）是一个复杂的酶系统，通过核心酶：泛素激活酶（E1，Ub-activating enzymes）、泛素偶联酶（E2，Ub-conjugating enzymes，UBC）、泛素连接酶（E3，Ub-ligases），将小分子量且高度保守的泛素分子连接到需被降解的蛋白上。泛素介导的途径在许多疾病的发生发展过程中起着重要作用，包括癌症、传染性疾病、心血管疾病和神经退行性疾病等，因此，已成为新的药物靶点[8,9]。

已有多个泛素类分子从大型真菌被分离，并发现其具有抑制增殖、抗艾滋病毒、核糖核酸酶活性[3]。然而，关于大型真菌 UPS 系统中核心酶 E1、E2、E3 很少有报道。本文克隆了大型真菌 *Agrocybe aegerita* 一种新型 UBC（E2）的 cDNA 序列，对其进行表达纯化，并研究其对肿瘤细胞的生物作用，为大型真菌活性组分提供新的数据。

1 材料与方法

1.1 UBC cDNA 基因克隆

使用 RNeasy Plant Mini Kit 提取茶树菇子实体总 RNA，按照 SMART cDNA Library Construction Kit 说明书构建 cDNA 文库。使用 ABI 377 DNA sequencer 对质粒 DNA 进行测序，获得序列进行预处理和拼接，产生表达序列标签 expressed sequence tag (EST)。翻译的 EST 通过 National Center for Biotechnology Information 的 nonredundant (nr) database 进行 BLASTX 比对，获得 UBC 的 cDNA 序列并提交。使用 ClustalW 比对 UBC 的氨基酸序列。

使用 *Pfu* DNA polymerase (Stratagene)，以 pDNR-lib-ubc 为模板，克隆 UBC 的序列。对于真核表达质粒 pEGFP-C1-Ubc，使用上游引物（*Eco*RI）：5’-ccgaattccatggggtctgtatccgc-3’，和下游引物（*Sal*I）：5’-acgcgtcgacctacacagtgtcatcat-3’。对原核表达质粒 pET28b-Ubc，使用上游引物（*Nco*I）：5’-catgccatgggg tc tgtatc-3’，和下游引物（*Xho*I）：5’-ccgctcgagcacagtgt catcatc-3’。纯化 PCR 产物，酶切，连接至载体 pEGFP-C1 和 pET28b(+)，获得的质粒 pEGFP-C1-UBC 和 pET-28b-UBC，分别带有 EGFP 和 His 标签.

1.2 转染 pEGFP-C1-Ubc 对 HeLa 细胞的作用

用脂质体 2000 转染质粒 pEGFP-C1-UBC 到 HeLa 细胞(2×10^5)，37 ℃培养 48 h 后，使用荧光显微镜下观察。收集细胞，用 PBS 洗涤，75%乙醇固定后置于 4 ℃ 2 h。用 RNase A(0.25 mg/mL)在 37 ℃处理细胞 1 小时。洗涤，用碘化丙啶（PI）在室温下对细胞染色 10 分钟。使用流式细胞仪(BECKMAN, EPICS ALTRA)分析细胞周期。

1.3 表达纯化重组蛋白 UBC

用大肠杆菌 BL21（DE3）表达带有 His 标签的重组 UBC，30 ℃。用 2 mM 的异丙基-*β*-thiodigalactoside 诱导表达 5.5 h，离心收集。用结合缓冲液（50 mM 的磷酸二氢钠，pH 8.0，300 mM 氯化钠，10 mM 咪唑）重悬细胞，1%溶菌酶（Novagen 公司）在室温下处理 30 min，6000 g 离心去除细胞碎片。将上清液上 NTA Ni^+螯合柱（Novagen 公司），目标蛋白用洗脱缓冲液（50 mM 的磷酸二氢钠，pH 8.0，300 mM 氯化钠，250 mM 咪唑）洗脱。使用超滤膜（Millipore 公司）浓缩、脱盐。纯化 UBC 收集冻干，储存于-20 ℃。纯化的蛋白通过 SDS-PAGE 进行检测。

1.4 Annexin V 染色和流式细胞仪分析

使用不同浓度（1.8、3.6、7.2 μM）UBC 处理 HeLa 细胞 48 h。胰蛋白酶消化细胞，PBS（pH 7.4）洗涤两次，用 Annexin V/ PI 凋亡试剂盒（MultiSciences 生物技术有限公司）检测细胞凋亡。1×10^5 个/mL 细胞密度重悬细胞于结合缓冲液，加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI 混合，避光温育 5 min，通过流式细胞仪(BECKMAN, EPICS ALTRA)分析结果。

1.5 统计学方法

应用统计软件 SPSS13.0 进行数据分析，组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD-t 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 克隆 UBC cDNA 序列并分析

为获得更多茶树菇活性蛋白质成分基因信息，我们构建了新鲜子实体 cDNA 文库，子实体 cDNA 文库的滴度约为 1.67×10^5 pfu，随机选择 342 个克隆进行测序分析。UBC 的 cDNA 序列（Genbank 登录代号：JQ362395）有 625 bp，其开放阅读框（ORF）长度为 459 bp，终止密码子为 TGA。编码氨基酸序列有 152 个氨基酸残基。

ClustalW 分析其氨基酸序列表明，茶树菇 UBC

与 *Sporisorium* 的 UBC（GenBank 登录代码：CBQ73841.1）和秆锈菌 *Puccinia graminis* UBC（GenBank 登录代码：XP_0033199100.1）分别有 55.6%和 51.5%的相似度（图 1）。泛素通路对细胞周期调控、信号转录调控、发育、细胞凋亡有重要作用[10]，UBC（E2）是泛素化途径或泛素类修饰途径中重要的酶分子[11]。虽然 E2 酶的多元化与 E1 酶和泛素结合模式有关，但许多家族的 UBC 酶还是具有一些非常保守的极性氨基酸[12]。图 1 对 3 种真菌 UBC 序列的比对显示，它们都含有功能性残基组氨酸（H），催化半胱氨酸（C）和疏水性残基色氨酸（W）。

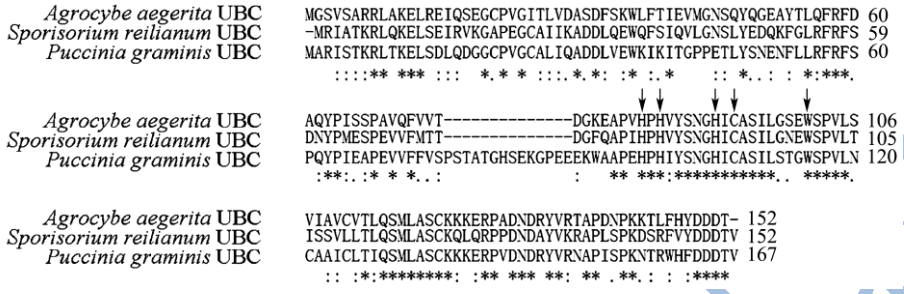


图 1 比对茶树菇、黑穗病菌 *Sporisorium*（Genbank accession number：CBQ73841.1）和秆锈菌 *Puccinia graminis*（GenBank 登录号：XP_003319910.1）泛素偶联酶（UBC）的氨基酸序列。

Fig.1 Deduced amino acid sequences of UBC from *Agrocybe aegerita* compared to those of *Sporisorium reilianum* (GenBank accession number: CBQ73841.1) and *Puccinia graminis* (GenBank accession number: XP_003319910.1)

注：*指相同的氨基酸残基，: 和 · 分别代表高相似度和低相似度的氨基酸残基。箭头代表 UBC 家族成员中多个保守氨基酸残基。

2.2 转染 pEGFP-C1-UBC 对 HeLa 细胞的影响

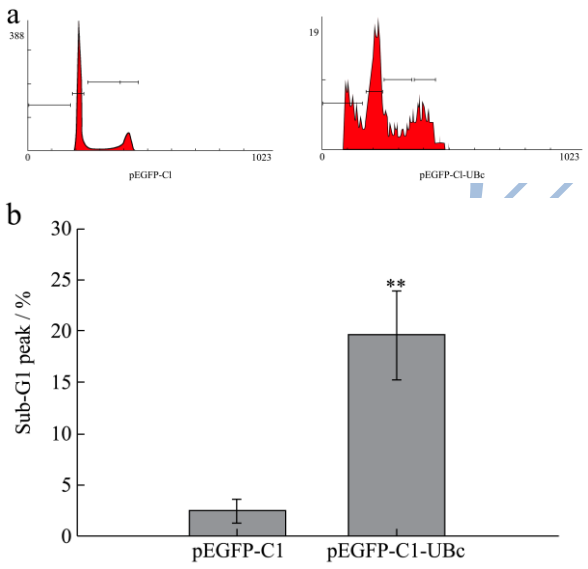


图 2 转染 pEGFP-C1-UBC 质粒对 HeLa 细胞的影响

Fig.2 Effect of transfecting HeLa cells with pEGFP-C1-UBC plasmid

注：a 质粒 pEGFP-C1-UBC 转染到 HeLa 细胞，48 h 后，用 PI 染色和流式细胞仪检测 UBC 的作用。质粒 pEGFP-C1 作为空白对照。b 细胞亚二倍体峰百分比。数据均重复 3 次，**p <0.01。

序列分析后，选择可能与大型真菌生物活性相关的基因，包括茶树菇 UBC，克隆至瞬时表达载体 pEGFP-C1 并转染 HeLa 细胞（数据未发表），使用 PI 染色和流式细胞仪测定表达蛋白对 HeLa 细胞的影响。HeLa 细胞转染质粒培养 48 h，流式细胞仪分析结果表明，UBC 基因的表达可诱导 HeLa 细胞凋亡（图 2a）。与空白对照组相比，pEGFP-C1-UBC 转染细胞使亚 G1 峰百分比由 2.46±1.15%增至 19.57±4.34%（图 2b）。

在整个大型真菌 EST 研究中，多数是研究与真菌生长发育代谢相关的，极少从它的药用活性方面进行阐述，这与蛋白质药用价值一直被忽略有关，也与大型真菌基因序列信息的缺乏有关。在文库序列分析之后，我们希望通过初步实验筛选其中与抗肿瘤相关的基因。泛素介导途径已被报告对细胞周期调控、信号转录调控、受体表达下调、细胞内吞、免疫反应、发育、细胞凋亡至关重要[10,8,13]。因此，UBC 蛋白有可能具有对肿瘤细胞的细胞毒性。

2.3 重组蛋白 UBC 的表达和纯化

基于上述推测，我们构建了原核表达质粒 pET28b-UBC，表达在大肠杆菌 BL21（DE3）。诱导后的大肠杆菌全细胞裂解上清中出现了明显的目的条带（图 3a，箭头所示），表达纯化后的 UBC 蛋白在 SDS-PAGE 胶上显示为单一条带（图 3b）。将表达纯化后的 UBC 蛋白冻干后称重，重组蛋白 UBC 纯化后的得率是 10 mg/L 大肠杆菌培养液。这说明，表达体系能够得到高产率的蛋白，且纯度在 90%以上。

大肠杆菌原核表达系统具有操作简单、表达量高、费用低等优点，但表达时蛋白不能进行糖基化且易形成包涵体。包涵体复性是一项比较复杂的工作，

且在复性过程中往往会出现蛋白质变性。在 37 ℃对 UBC 诱导表达时，容易形成包涵体，且诱导表达 UBC 蛋白的稳定性较低，透析除盐后易发生变性。为避免进行包涵体复性，增加目的蛋白稳定性，我们采取只对可溶性蛋白进行纯化；同时降低诱导表达温度，由 37℃降低至 30℃，能够显著增加可溶性 UBC 蛋白的稳定性及得率。

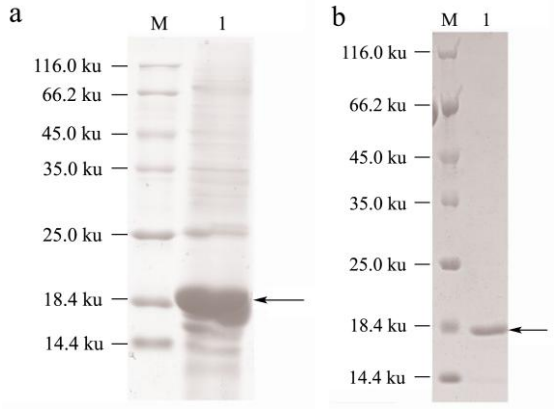


图 3 泛素偶联酶（UBC）的表达和纯化

Fig.3 Expression and purification of UBC

注：a.SDS-PAGE 检测 UBC 在大肠杆菌中的表达。M：蛋白 marker，泳道 1：大肠杆菌全细胞裂解液，箭头指 UBC 蛋白。b.使用 SDS-PAGE 检测 Ni 柱纯化后的 UBC。M：蛋白 marker，泳道 1：纯化的蛋白，箭头指 UBC 蛋白。

2.4 重组蛋白 UBC 的促凋亡活性

为评估重组蛋白 UBC 的促凋亡活性，分别加入终浓度为 1.8、3.6、7.2 μM 的 UBC 蛋白到 HeLa 细胞培养基中。图 4a 所示，培养 48 h 后，UBC 处理的 HeLa 细胞形态发生显著变化，与未经处理的对照组相比，UBC 处理组 HeLa 细胞形态出现变圆现象，且呈浓度依赖性，随着 UBC 蛋白浓度的升高，出现凋亡现象的细胞数目增多。

为了区分细胞凋亡和坏死，确定 UBC 蛋白诱导 Hela 细胞凋亡的影响，使用 Annexin V 和 PI 双染的方法检测凋亡。收集细胞，使用 Annexin V/PI 染色，流式细胞仪分析结果（图 4b）显示，阴性对照组细胞生长正常，Annexin V^+PI^+细胞和 Annexin V^+ PI^-细胞的比例仅为 0.6%和 1.4%，当用 1.8 μM UBC 蛋白处理 HeLa 细胞后，Annexin V^+ PI^+的细胞和 Annexin V^+ PI^-的细胞比例增加到 5.4%和 10.7%；而分别用 3.6 μM 和 7.2 μM UBC 蛋白处理细胞后，Annexin V^+ PI^+的细胞比例改变不大，但 Annexin V^+ PI^-的细胞比列却分别增加至 15.8%和 20.3% 。由此可见，UBC 蛋白能够诱导 Hela 细胞发生凋亡。

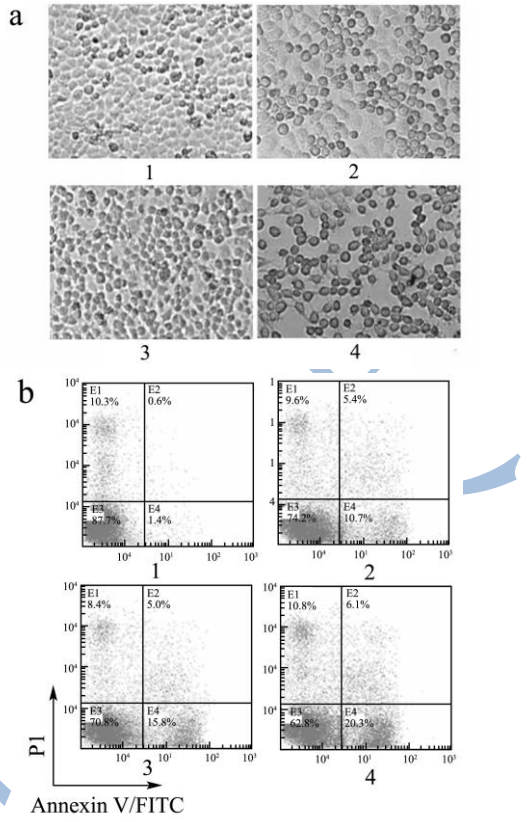


图 4 UBC 对 HeLa 细胞的促凋亡活性

Fig.4 Pro-apoptotic activity of UBC in HeLa cells

注：a：将 UBC 加入 HeLa 细胞培养基，48 h 后，细胞形态的改变由相差显微镜拍摄。1 为 vehicle 对照，2~4 分别是 1.8、3.6、7.2 μM 的 UBC。放大倍数为 200 倍。B：使用 Annexin V/PI 染色检测 HeLa 细胞凋亡，Annexin V^+/PI^-百分比的细胞对照组为 1.4%，UBC 处理组则随蛋白浓度的提高增加到 10.7%、15.8%和 20.3%。

蛋白质的降解是细胞迅速适应外界环境改变或新陈代谢以保证机体平衡状态的主要条件。虽有转录翻译水平的调节，但蛋白质翻译后的修饰譬如泛素化则是一种更加迅速的机制[13]。经初步估计细胞中 80%蛋白质是通过泛素蛋白酶途径降解的，一旦其中任何一环节发生故障，就会造成各种各样的疾病，包括癌症。虽然泛素蛋白酶系统中有相当大一部分还没有被理解清楚，但是就目前研究表明，这个系统中的分子可以也已经作为靶标用于抗肿瘤药物的设计。其中包括针对泛素激活分子（抑制泛素的激活或者抑制 E1 和 E2 的相互作用）；针对泛素连接酶（抑制 E2 和 E3 的相互作用或者抑制 E3 和底物的相互作用）；针对泛素连接酶下游分子（抑制蛋白酶体以及泛素分子的聚合物）。临床试验表明针对泛素蛋白酶系统设计的药物具有对恶性肿瘤选择性杀伤能力；可以与其他药物协同作用增强药效；具有放疗增敏作用；可诱导

促凋亡基因的表达。

从大型真菌中提取的具抗增殖活性的 UPS 系统成员，只有零星的报道：例如从 *Calvatia caelata* 分离的N端类似泛素分子可抑制脾脏和乳腺癌细胞的增殖[14]，茶树菇的近源种 *Agrocybe cylindracea* 分离的 N 端类似泛素分子可抑制白血病细胞 M1 和肝癌细胞 HepG2 的增殖活性[15]，大型真菌 UPS 系统中核心酶 E1、E2、E3 具促凋亡活性还未见有报道。本文的发现：UBC 可诱导肿瘤细胞凋亡，暗示泛素蛋白酶系统分子的活性值得进一步研究，尤其是肿瘤细胞在增殖过程中产生的大量癌蛋白及非正常蛋白，比正常细胞对针对泛素蛋白酶系统的药物反应更灵敏，因此研究此类蛋白更有助于我们开发靶向型的抗肿瘤药物。当然，体外实验的活性并不能完全说明体内试验的结果，所以为了验证 UBC 蛋白的抗肿瘤活性，需要在将来的研究中利用荷瘤小鼠模型来进一步探讨 UBC 蛋白的活性价值。

3 结论

本研究表达和纯化茶树菇 UBC 蛋白，外加到培养基中可诱导 HeLa 细胞凋亡。这是第一个有关具抗肿瘤活性的真菌 UBC 报告。由于 UPS 系统成员参与许多疾病发生发展过程，结合本文发现，说明大型真菌泛素系统成员可能通过干扰细胞基本生理过程，如重要信号转导的泛素修饰，使之成为潜在的候选药物，进一步研究将为大型真菌的活性解析提供数据支持。

参考文献

[1] BORCHERS Andrea T, KEEN Carl L, GERSHWIN M Eric. Mushrooms, tumors, and immunity: an update [J]. Exp. Biol. Med. (Maywood), 2004, 229(5): 393-406

[2] ZAIDMAN Ben-Zion, YASSIN Majed, MAHAJNA Jamal, et al. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2005, 67(4): 453-468

[3] NG T B. Peptides and Proteins from Fungi [J]. Peptides, 2004, 25(6): 1055-1073

[4] LIANG Yi, CHEN Yijie, LIU Honghong, et al. The tumor rejection effect of protein components from medicinal fungus [J]. Biomedicine & Preventive Nutrition, 2011, 1(4): 245-254

[5] 梁一,郭莲仙,孙慧.茶树菇活性蛋白组分对荷瘤小鼠免疫调节功能研究[J].现代食品科技,2014,30(7): 1-5
LIANG Yi, GUO Lian-xian, SUN Hui. The immune regulation effect of active protein components from agrocybe aegerita on tumor-bearing mouse model [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(7): 1-5

[6] ZHAO Chen-guang, SUN Hui, TONG Xin et al. An antitumour lectin from the edible mushroom agrocybe aegerita [J]. Biochem. J., 2003, 374(2): 321-327

[7] JIANG Shuai, CHEN Yi-jie, WANG Man, et al. A novel lectin from agrocybe aegerita shows high binding selectivity for terminal n-acetylglucosamine [J]. Biochem. J., 2012, 443(2): 369-378

[8] BEDFORD Lynn, LOWE James, DICK Lawrence R, et al. Ubiquitin-like protein conjugation and the ubiquitin-proteasome system as drug targets [J]. Nat. Rev. Drug Discov., 2010, 10(1): 29-46

[9] RIEDERER Beat M, LEUBA Genevieve, VERNAY Andre et al. The role of the ubiquitin proteasome system in alzheimer's disease [J]. Exp. Biol. Med. (Maywood), 2011, 236(3): 268-276

[10] WHITCOMB Elizabeth A, TAYLOR Allen. Ubiquitin control of S phase: A new role for the ubiquitin conjugating enzyme, Ubch7 [J]. Cell Div., 2009: 417

[11] SOSS Sarah E, YUE Yuanyuan, DHE-PAGANON Sirano, et al. E2 Conjugating Enzyme Selectivity and Requirements for Function of the E3 Ubiquitin Ligase Chip [J]. J. Biol. Chem., 2011, 286(24): 21277-21286

[12] BURROUGHS A Maxwell, JAFFEE Marcie, IYER Lakshminarayan M, et al. Anatomy of the E2 ligase fold: implications for enzymology and evolution of ubiquitin/ub-like protein conjugation [J]. J. Struct. Biol., 2008, 162(2): 205-218

[13] DRISCOLL James J, MINTER Alex, DRISCOLL Daniel A, et al. The ubiquitin+proteasome protein degradation pathway as a therapeutic strategy in the treatment of solid tumor malignancies [J]. Anticancer Agents Med. Chem., 2011, 11(2): 242-246

[14] LAM Y W, NG T B, WANG H X. Antiproliferative and antimitogenic activities in a peptide from puffball mushroom calvatia caelata [J]. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2001, 289(3): 744-749

[15] NGAI Patrick H K, WANG H X, NG T B. Purification and characterization of a ubiquitin-like peptide with macrophage stimulating, antiproliferative and ribonuclease activities from the mushroom agrocybe cylindracea [J]. Peptides, 2003, 24(5): 639-645