

上海交通大学

SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY

学士学位论文

BACHELOR'S THESIS



论文题目： 重组灵芝免疫调节蛋白 (rFIP-glu)
对小鼠黑色素瘤细胞 B16 功能的初步探索

学生姓名： 黎刘定吉

学生学号： 516150910046

专 业： 植物科学与技术

指导教师： 周选围

学院(系)： 农业与生物学院



上海交通大学

SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY 重组灵芝免疫调节蛋白 (rFIP-glu) 对小鼠黑色素瘤细胞 B16 功能的初步探索

上海交通大学

本科生毕业设计（论文）任务书

课题名称： 重组灵芝免疫调节蛋白 (rFIP-glu)
对小鼠黑色素瘤细胞 B16 功能的初步探索

执行时间： 2019 年 11 月 至 2020 年 05
月

教师姓名： 周选围 职称： 教授

学生姓名： 黎刘定吉 学号： 516150910046

专业名称： 植物科学与技术

学院(系)： 农业与生物学院



毕业设计（论文）基本内容和要求：

一、基本内容：

1. 利用实验室保存的质粒，构建重组灵芝免疫调节蛋白真核和原核工程菌；
2. 利用重组菌株表达生产，并用亲和层析法纯化重组灵芝免疫调节蛋白；
3. 探究重组蛋白对小鼠黑色素瘤细胞 B16 细胞活力、细胞内黑色素生长情况、酪氨酸酶活性等指标的影响；
4. 探究重组蛋白对小鼠黑色素瘤细胞 B16 细胞凋亡等信号通路的作用。

二、具体要求：

1. 学生刻苦努力，能够吃苦耐劳，有一定的学习能力；
2. 能够按照任务书的规定，在教师的指导下，独立完成所要求的内容，严禁抄袭、篡改实验数据等一切学术不端行为；
3. 具有一定的分子生物学和细胞生物学等相关学科背景，动手能力强。



毕业设计（论文）进度安排：

序号	毕业设计（论文）各阶段内容	时间安排	备 注
1	文献综述、熟悉实验技能	2019.10-2019.12	
2	构建工程菌、表达纯化重组蛋白	2019.12-2020.01	
3	探究重组蛋白对 B16 的影响和作用	2020.02-2020.04	
4	撰写论文，进行答辩	2020.04-2020.05	

课题信息：

课题性质：设计☐ 论文☒

课题来源*：国家级☐ 省部级☐ 校级☐ 横向☒ 预研☐

项目编号 19H401000027

其他_____

指导教师签名： 周选围

2019 年 10 月 15 日

学院（系）意见：

审核通过

院长（系主任）签名： 潘琪芳

2019 年 11 月 9 日

学生签名： 黎刘定吉

2019 年 10 月 15 日



上海交通大学 毕业设计（论文）学术诚信声明

本人郑重声明：所呈交的毕业设计（论文），是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

作者签名：黎刘定吉

日期：2020 年 6 月 23 日



上海交通大学 毕业设计（论文）版权使用授权书

本毕业设计（论文）作者同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权上海交通大学可以将本毕业设计（论文）的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本毕业设计（论文）。

保密 ☐，在____年解密后适用本授权书。

本论文属于

不保密 ☒。

（请在以上方框内打“√”）

作者签名： 黎刘定吉

指导教师签名：周选围

日期：2020 年 6 月 23 日

日期：2020 年 6 月 23 日



重组灵芝免疫调节蛋白 (rFIP-glu) 对小鼠黑色素瘤细胞 B16 功能的初步探索

摘要

灵芝免疫调节蛋白 (FIP-glu) 作为灵芝中研究最多的活性成分之一, 已被证实具有抗肿瘤、抗衰老等生物学功能, 具有极高的药用研究价值。黑色素细胞作为一类广泛存在于脊椎动物皮肤中的细胞, 具有能分泌具有保护皮肤免受环境因子伤害的黑色素的功能, 当其发生癌变时会变成恶性黑色素瘤细胞, 近年来发病率在不断攀升, 病死率高。利用基因工程构建了可以生产重组灵芝免疫调节蛋白 (rFIP-glu) 的毕赤酵母 GS115 工程菌, 基于 rFIP-glu 构建的糖基化突变体 rFIP-glu N31S、rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N 具有更佳的生物学活性和对巨噬细胞更低的毒性。因此, 本研究利用 rFIP-glu N31S、rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N 三种 rFIP-glu, 作用于小鼠黑色素瘤 B16 细胞, 发现 rFIP-glu 能抑制 B16 细胞的活力并促进凋亡, 通过表达水平的研究发现 rFIP-glu 主要是通过 MAPKs 途径中的 ERK 途径来作用于 B16 细胞, 具有抑制增殖和促进凋亡的功能; 同时, 发现 rFIP-glu 能够提升 B16 细胞表达黑色素的含量、促进酪氨酸酶活性, 通过 RT-qPCR 来验证酪氨酸酶相关基因后, 发现 rFIP-glu 是通过 *MITF* 基因来促进黑色素合成关键酶 TYR、TYRP-1 和 TYRP-2 的表达来提升 B16 细胞内黑色素含量的。综上所述, rFIP-glu 具有抑制黑色素瘤细胞活力、促进凋亡的作用, 同时能够提高黑色素合成含量, 可以作为具有保护皮肤、抑制黑色素瘤细胞功能的营养品、护肤品或者药品的原料。

关键词: 重组灵芝免疫调节蛋白, 黑色素瘤细胞, MAPKs, 黑色素, 酪氨酸酶



PRELIMINARY EXPLORATION OF THE FUNCTION OF RECOMBINANT GANODERMA IMMUNOMODULATORY PROTEIN (RFIP-GLU) ON MOUSE MELANOMA CELL B16

ABSTRACT

Ganoderma lucidum immunomodulatory protein (FIP-glu), one of the hottest active ingredients in *Ganoderma lucidum*, has been shown to have anti-tumor, anti-aging and other biological functions, and is of high medicinal research value. Melanocytes, as a class of cells widely found in the skin of vertebrates, have the function of secreting melanin, which can protect the skin from environmental factors, and turn into malignant melanoma cells when they become cancerous. The glycosylated mutants rFIP-glu N31S, rFIP-glu T36N, and rFIP-glu N31S/T36N, which are based on rFIP-glu, have better biological activity and lower toxicity to macrophages, using genetic engineering to construct the yeast GS115 engineering bacteria that can produce recombinant *Ganoderma lucidum* immunomodulatory protein (rFIP-glu). Therefore, in this study, three rFIP-glu, rFIP-glu N31S, rFIP-glu T36N and rFIP-glu N31S/T36N, were used in mouse melanoma B16 cells, and it was found that rFIP-glu can inhibit the viability of B16 cells and promote apoptosis. rFIP-glu was found to act on B16 cells mainly through the ERK pathway in the MAPKs pathway and has the function of inhibiting proliferation and promoting apoptosis by the expression level study; meanwhile, it was found that rFIP-glu can enhance the expression of melanin in B16 cells and promote tyrosinase activity, and after validating tyrosinase-related genes by RT-qPCR, it was found that rFIP-glu can enhance the melanin content in B16 cells by promoting the expression of TYR, TYRP-1 and TYRP-2, key enzymes of melanin synthesis, through the *MITF* gene. In summary, rFIP-glu has the effect of inhibiting melanoma cell viability and promoting apoptosis, as well as increasing melanin synthesis, and can be used as a raw material for nutrients, skin care products or pharmaceuticals that protect the skin and inhibit melanoma cell function.

Key words: rFIP-glu, melanoma cells, MAPKs, melanin, tyrosinase



目 录

第一章 绪论	1
1.1 灵芝免疫调节蛋白	1
1.1.1 灵芝免疫调节蛋白的结构	1
1.1.2 重组灵芝免疫调节蛋白的生物学作用	2
1.2 黑色素瘤细胞	3
1.2.1 黑色素瘤	3
1.2.2 黑色素与酪氨酸酶	4
1.2.3 细胞 MAPKs 信号通路	4
1.3 研究目的和意义	5
1.4 研究内容和技术路线	6
第二章 实验材料及方法	7
2.1 实验材料	7
2.1.1 载体、菌株及细胞	7
2.1.2 试剂	7
2.1.3 培养基	8
2.1.4 抗体	9
2.1.5 仪器	9
2.1.6 引物	10
2.2 实验方法	11
2.2.1 重组灵芝免疫调节蛋白工程菌构建	11
2.2.2 重组灵芝免疫调节蛋白表达及纯化	13
2.2.3 小鼠黑色素瘤细胞 B16 的培养	15
2.2.4 细胞毒性检测实验	16
2.2.5 细胞凋亡实验	17
2.2.6 B16 细胞黑色素含量测定	18
2.2.7 B16 细胞酪氨酸酶活性测定	18
2.2.8 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)	18
2.2.9 Western Blot 分析	20
第三章 结果与分析	22
3.1 重组灵芝免疫调节蛋白的获得	22
3.2 rFIP-glu 对 B16 细胞活性的影响	23
3.3 rFIP-glu 对 B16 细胞 MAPKs 信号通路的翻译水平影响	24
3.4 rFIP-glu 对 B16 细胞内黑色素含量的影响	25
3.5 rFIP-glu 对 B16 细胞内酪氨酸酶活性的影响	26
3.6 rFIP-glu 对 B16 细胞合成黑色素转录水平的影响	27
第四章 总结与展望	28
4.1 总结与讨论	28
4.2 rFIP-glu 应用前景展望	29
4.3 创新点	30
参考文献	31
谢辞	36



第一章 绪论

灵芝 (*Ganoderma Karst.*) 作为一种中国珍贵的传统药用真菌，属于担子菌纲 (Basidiomycetes) 多孔菌目 (Polyporales) 灵芝科 (*Ganoderma taceat*)，其模式种为赤灵芝 (*Ganoderma lucidum*)，在中文语境中普遍意义上所讲的灵芝，指代的即为赤灵芝。灵芝一直以来都被看作为华夏传统医药中的名贵材料，占有极为重要的地位，多部中国历史上的医药学典籍记载了灵芝的药用价值，例如《神农本草经》《本草纲目》等中药学著作，记载了灵芝具有“好颜色”“益心气”“安精魂增智慧”等功效^[1]。现代医药学研究对于灵芝的功效有了更加深入的研究，证明灵芝及灵芝提取物具有抗癌抗肿瘤^[2-4]、保护心血管系统^[5]、对肝保护和解毒^[6]，保护支气管等呼吸系统^[6]等等作用，最新研究也表明了灵芝及其提取物在抗皱、消炎、清除色斑、保护皮肤等方面具有一定的功效^[7]，具有作为化妆品原料的潜力^[8]。灵芝中富含了多种对人体有益的活性成分，例如多糖类、蛋白聚糖、蛋白质以及萜系化合物等等，此外还有一些生物碱、醌类、甾醇、色素类、类脂、环肽以及非蛋白氨基酸等等^[9]。灵芝所含的这些物质在增强机体免疫、抗衰老、抗过敏、抗菌、影响黑色素生产、促进皮肤吸收上有着显著的效果，在人类防病、治病中发挥着重要的作用^[10]。正因为灵芝具有上述的多种功效，有人推测灵芝可以通过影响黑色素细胞生长，调节黑色素的生成来做到治疗黑色素瘤、皮肤白化病等疾病，也可以通过在化妆品中添加适量的灵芝提取物来达到保护皮肤的作用，许多相关研究已经展开。

1.1 灵芝免疫调节蛋白

灵芝免疫调节蛋白 (FIP-glu) 是真菌免疫调节蛋白家族 (Fungal immunomodulatory proteins, FIPs) 中的一种，由于其具有免疫调节的活性而被广泛研究，是灵芝中一类重要的活性成分。目前为止，已有超过 35 种 FIPs 被发现，其中最早是由 Kino 等人在 30 多年前，从赤灵芝中分离得到的一类小分子蛋白质，并认为其具有免疫调节的功能^[11]，起初被人称为 Linzhi-8 (LZ-8)，后来统一命名为 FIP-glu。

1.1.1 灵芝免疫调节蛋白的结构

根据 FIPs 中的保守序列以及蛋白质的特性，可以将其大致分为五个亚群，其中数量最多、研究最多的是 Fve 型 (Pfam PF09259) FIPs 亚群，一般来说，这个亚群的蛋白由 110-125 个氨基酸组成，分子量约为 13 kDa (千道尔顿, kilo-Dalton)，而其他四种亚群，Cerato 型 (Pfam PF07249) FIPs、PCP (茯苓免疫调节蛋白) 型 FIPs、TFP (银耳免疫调节蛋白) 型 FIPs 和其他 FIPs，现有研究较少。本研究的研究对象 FIP-glu 就属于 Fve 型 FIP。

根据对从松杉灵芝 (*Ganoderma tsugae*) 提取出来的 FIP-gts (一种 Fve 型 FIP) 的二级结构进行研究，发现该蛋白单体含有 2 个 α 螺旋、7 个 β 折叠和 1 个 β 转角，在蛋白 N 端的 13 个氨基酸是构成二聚结构的关键氨基酸，包括组成第一个 α 螺旋的 10 个氨基酸^[12]，这也是所有 Fve 型 FIPs 的基本结构。Fve 型 FIPs 的单体通过疏水相互作用和氢键等非共价作用组装成同型二聚体或四聚体，通过结构域交换^[13,14]维持的二聚体化主要取决于 N 端的 α -螺旋和 β -折叠^[15]。这种同型二聚体的结构对于 FIPs 的生物学功能具有极其重要意义，例如在发挥免疫调节、诱导炎症因子表达等。在先前的研究中发现，若将 FIP-gts 的 N 端 α 螺旋结构进行缺失突变，得到的缺失突变体无法诱导白细胞介素 (interleukin, IL)-2 和 γ -干扰素 (interferon γ , IFN- γ) 的表达，活性降低^[12]。

使用 SWISS-MODEL 工具，通过同源建模方法^[16,17]对 FIP-glu 的 3D 结构进行预测，再



使用 PyMOL 2.3.4 软件对蛋白三维结构图进行模拟, 得到图 1-1, 如图所示图 1-1 (a) 中深蓝色部分为 N 端, 包含一个 α 螺旋结构, 在同型二聚体状态下, 如图 1-1 (b), 两个蛋白单体的 N 端 α 螺旋结构相互靠近。

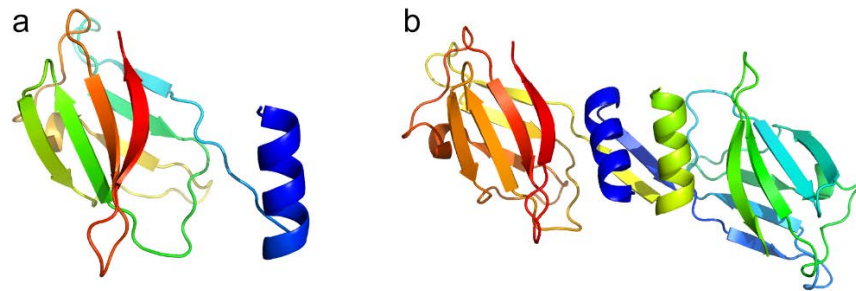


图 1-1 FIP-glu 三维结构预测图

(a) FIP-glu 单体三维结构; (b) FIP-glu 同型二聚体三维结构

早在 1989 年, FIP-glu 被分离出来后, 就被鉴定出这个由 110 个氨基酸组成的蛋白的具有 N 端乙酰化的末端^[18], 在之后分离出来的天然 FIPs 中, 其中一些具有糖基化修饰^[19]。说明, FIPs 具有表达后修饰的潜力, 通过乙酰化、磷酸化、糖基化等手段, 可以改善蛋白的活性。之后有研究通过基因工程手段, 使用毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115 表达系统生产了重组 FIP-glu (recombinant FIP-glu, rFIP-glu), 经过生物信息学分析后, 发现该 rFIP-glu 具有多个 N-糖基化位点 (Asn-X-Ser/Thr)^[20]。先前研究表明, 对蛋白进行 N-糖基化位点进行定点突变, 蛋白产量^[21]、稳定性^[22]、生物学活性^[23]等均有一定的提高。2013 年, Bastiaan-Net 等人在毕赤酵母中表达了重组 FIP-fve (recombinant FIP-fve, rFIP-fve), 都可以将 FIP-fve 上两个预测的糖基化位点, 第 36 位和第 54 位的天冬酰胺 (Asparagine, Asn, N) 糖基化^[24]。Wu 等人研究认为, 在昆虫卵巢细胞 (Sf21) 中表达的重组 FIP-gts (recombinant FIP-gts, rFIP-gts) 可以产生糖基化的形式以及非糖基化的形式, 相对分子质量分别为 15 kDa 和 13.5 kDa, 可以通过糖蛋白染色证实^[25]。在我们先前的研究中, 对 rFIP-glu 进行了糖基化位点的定点突变^[20,26], 得到了三种不同的糖基化蛋白: 将 rFIP-glu 的第 31 位的 N 定点突变成丝氨酸 (Serine, Ser, S), 称之为 rFIP-glu N31S; 将 rFIP-glu 的第 36 位的苏氨酸 (Threonine, Thr, T) 定点突变成 N, 称之为 rFIP-glu T36N; 将 rFIP-glu 的第 31 位 N 定点突变为 S, 同时将第 36 位的 T 定点突变成 N, 称之为 rFIP-glu N31S/T36N。根据验证, 其中 rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N 的糖基化水平较高, 可以在过碘酸-希夫试剂 (Periodic acid-Schiff, PAS) 染色下显示出单一条带, 而 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 结果下, rFIP-glu N31S 在 15 kDa 左右有单一条带, rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N 在 15 和 18 kDa 左右均有条带^[20]。

根据先前的试验结果, rFIP-glu N31S、rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N 相较于未突变的野生型 rFIP-glu, 其生物学活性有显著提升, 在处理小鼠腹腔巨噬细胞 (macrophages, m ϕ) RAW264.7 后, 表达水平上诱导细胞因子的能力有显著的提升, 并且对于细胞的毒性降低^[26]。rFIP-glu N31S、rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N 相较于野生型 rFIP-glu 具有更高的应用潜力, 并且现有的文献中还未有使用这些 rFIP-glu 进行更进一步生物学活性的探究。

1.1.2 重组灵芝免疫调节蛋白的生物学作用

已有文献研究报道, Fve 型 FIPs 可以调节细胞免疫和体液免疫, 其中包括激活免疫细胞, 导致免疫介导的抗敏、抗炎、抗肿瘤作用。Fve 型 FIPs 通过诱导细胞因子和趋化因子的



分泌, 增加细胞粘附分子的表达, 以及增强淋巴细胞的增殖, 从而激活免疫细胞。例如, FIP-vvo (来源 *Volvariella volvacea*)^[27] 和 FIP-gsi (来源 *Ganoderma sinensis*)^[28] 可诱导 IL-4、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和淋巴毒素 (lymphotoxin, LT) 的转录表达, 而用 FIP-glu^[29] 或 FIP-fve^[30] 处理后, 没有发现对 IL-4 分泌的显著调控。然而, 大多数 FIPs 可使小鼠脾细胞和人外周血淋巴细胞 (human peripheral blood lymphocyte, hPBLs) 增殖, 并诱导 IL-2、IFN- γ 和 IL-2 受体 (IL-2 receptor, IL-2R) 的转录表达。

作为 Fve 型 FIPs 中研究最多的 FIP-glu 具有明显的免疫调节功能^[31], 同时在抗过敏^[32]、抗肿瘤^[33]、促淋巴细胞增殖^[18]、提升细胞分泌细胞因子含量^[34]和抗移植排斥等方面, 也起着重要作用。FIP-glu 能调控炎症介质, 对乙型肝炎的表面抗原引起的抗体有明显的抑制作用^[35]。炎症是活体组织对于损伤因子如病原体、刺激物等的防御反应, 致炎因子刺激机体后会激活体内巨噬细胞并合成释放多种炎症介质 (inflammatory mediator), 如一氧化氮 (Nitric Monoxide, NO)、氧自由基 (ROS)、TNF- α 、单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1/CCL-2)、一氧化氮合成酶 (iNOS)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 等细胞因子, 这些炎症介质具有血管扩张、血管通透性升高、发热、疼痛等作用, 诱导炎症发生^[34]。在 FIPs 诱导 RAW264.7 细胞相关炎症介质基因转录的实验中, rFIP-glu 能够显著提高 TNF- α 、MCP-1、精氨酸酶 II (Arginase II)、iNOS 和 TGF- β 1 的信使 RNA (message RNA, mRNA) 水平, 并降低 IL-10 和 CXCL-10 的 mRNA 水平。在我们先前的研究中, 通过实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-time PCR, RT-qPCR) 和转录组测序技术, 证明了 rFIP-glu 会通过 MAPK (丝裂原活化蛋白激酶, mitogen-activated protein kinase) 和 PI3K (磷脂酰肌醇-3 激酶, phosphatidylinositol 3-kinase) 信号通路发挥免疫调节的作用^[20,31]; 通过定点突变技术构建了 rFIP-glu 突变体 rFIP-glu N31S、rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N, 来研究 N-糖基化修饰在 FIPs 结构和功能中的作用, 先前的研究中表明 N-糖基化显著降低了 rFIP-glu 对巨噬细胞的毒性, 并且生物学活性有所提高。

1.2 黑色素瘤细胞

黑色素细胞 (melanocyte, MC) 是一类主要存在于皮肤中的特殊细胞^[36], 能够合成黑色素 (melanin) 并分泌到周围的角质层, 起到保护皮肤的作用^[37]。而小鼠黑色素瘤 B16 细胞是一种广泛用于科学研究的黑色素瘤高转移细胞株, 其来源及基因背景已十分清楚^[38]。

1.2.1 黑色素瘤

黑色素瘤通常是由黑色素细胞癌变而来的肿瘤细胞, 在我国, 虽然恶性黑色素瘤较少见, 但病死率高, 发病率也每年不断增加^[39]。黑色素瘤可发生于皮肤、粘膜、软脑膜等不同部位或组织, 并且在皮肤组织部位上发病的概率最高, 曾被日光严重晒伤的人群是患上皮肤黑色素瘤的高危人群^[40]。恶性黑色素瘤具有转移和侵袭特性, 发病迅速, 在进展期, 恶性黑色素瘤患者平均生存期仅 6-9 个月^[41]。

黑色素瘤细胞的诱导凋亡能力相较于正常细胞大幅下降, 对日常中广泛的刺激源反应失效, 因此常规治疗方法对于抑制黑色素瘤细胞转移和增殖效果较差^[41]。有研究对比了小鼠正常黑色素细胞和小鼠黑色素瘤 B16 细胞在 mRNA 水平上的差异, 发现 B16 细胞的多个与癌症相关的信号通路均有变化, 例如常见的 MAPK 通路、TGF- β (转化生长因子- β , transforming growth factor- β) 通路、NF- κ B (核因子 κ B, nuclear factor kappa-B) 通路等等, 多个调控通路被激活。此外, 与黑色素合成的相关酶基因, 如酪氨酸酶 (tyrosinase, TYR), 酪氨酸相关蛋白-1 (tyrosinase-related protein 1, TYRP-1), 酪氨酸相关蛋白-2 (tyrosinase-related protein 2, TYRP-2) 和黑色素生成相关转录因子表达均有所上调^[38], 黑色素表达量增加。

在现有研究中, 已经知道 rFIP-glu 可以抑制 B16 细胞的增殖^[42], 但还未有深入的研究



来探究 rFIP-glu 如何通过细胞信号通路来影响 B16 细胞的生物学活性。

1.2.2 黑色素与酪氨酸酶

脊椎动物的肤色是由多种色素协同作用得到的结果,其中起决定性作用的是黑色素含量^[43-45]。外界环境因素如太阳中的紫外线照射会使皮肤中的黑色素生成相关酶代谢紊乱,导致肤色变黑,甚至产生皮肤相关癌症^[46]。

黑色素是一种蛋白质衍生物,主要分为真黑素 (eumelanin) 和褪黑素 (pheomelanin) 两大类^[47],由细胞本身的黑色素小体中的底物酪氨酸在限速酶酪氨酸酶催化下经过一系列氧化连接反应生成,黑色素颗粒最终落在角质层中,构成了肉眼可见的色素沉积^[48]。过多的黑色素的生成是皮肤变黄变黑的重要原因之一,因此许多化妆品会添加能够抑制黑色素生成的原料^[45],来达到美容美白的效果。先前的研究也发现,灵芝及灵芝提取物,有能抑制黑色素合成的功效^[8,42,49]。但相对的,黑色素也对生物体起着保护的作用。有研究使用含黑色素的培养基培养经过紫外辐射的果蝇,发现从乌鸡皮肤提取的黑色素能延长辐射处理的果蝇寿命,并提高繁殖能力,对紫外照射起到了辐射保护作用,推测黑色素能够清除 ROS^[50]。黑色素能防止由于紫外线照射而导致的脱氧核糖核苷酸 (Deoxyribo Nucleic Acid, DNA) 双链断裂^[51],减轻皮肤被紫外光照射后的晒黑现象^[52]。

与黑色素合成密切相关的酶,是在微生物、动物和人体中都存在的酪氨酸酶^[53]。早在上个世纪,就已经对酪氨酸酶参与合成黑色素的作用机理有着详细的研究^[54]:人体中必须的酪氨酸作为底物,在黑色素细胞中的酪氨酸酶催化下被氧化成多巴醌 (dopaquinone),多巴醌可以自动氧化成多巴 (dopa) 和多巴色素 (dopachrome),多巴在酪氨酸酶催化下又能氧化成多巴醌,多巴色素可以经过两条合成途径生成真黑素:其一是经过脱羧反应,生成 5,6-二羧基吡咯 (DHI),在酪氨酸酶的作用下生成 5,6-吡咯醌 (IQ),最后生成黑色素;另一条途径是多巴色素被 TYRP-2 催化氧化成 5,6-二羟基吡咯羧酸 (DHICA),再在 TYRP-1 的催化下得到吡咯-5,6-醌-2-羧酸 (ICAQ),最终生成真黑素。前一条途径在正常黑色素细胞中占大多数。而合成褐黑素的途径就比较简单,多巴醌被体内的谷胱甘肽 (glutathione, r-glutamyl cysteinyl + glycine, GSH) 或半胱氨酸 (Cysteine, Cys) 氧化变成半胱氨酰多巴 (Cys-dopa),再经过一系列的反应最终生成褐黑素。

除了上述过程涉及的酶外,还有一个重要的基因控制着整个黑色素合成的反应,小眼畸形相关转录因子 (melanogenesis associated transcription factor, *MITF*) 基因,该基因控制着 TYP、TYRP-1 和 TYRP-2 的表达^[55,56],并且也受到多种信号通路的调控,如 MAPKs 信号通路和 PI3K 信号通路^[57]。*MITF* 基因是黑色素瘤细胞的原癌基因,一般情况下能促进肿瘤增殖,但是 *MITF* 作为黑色素细胞分化的重要标志物,其与肿瘤的侵袭能力呈负相关,具有一定的抗肿瘤活性^[58]。因此,有学者提出了 *MITF* 基因具有双重性,在低水平 *MITF* 基因表达时细胞增殖速率减慢、浸润转移能力增强;在中等水平表达时促进细胞增殖;在高水平表达时,细胞周期停滞,增殖减缓;而在极低水平表达时,细胞开始凋亡^[59]。

因此,在本研究探究 B16 细胞在黑色素表达相关的基因, TYP、TYRP-1 和 TYRP-2 作为黑色素合成过程中的关键酶,需要探究 rFIP-glu 对于这些酶的基因表达水平。此外,还需探究 *MITF* 基因表达水平,侧面验证黑色素合成相关酶表达量,并且与调控黑色素瘤细胞生长情况进行相对应。

1.2.3 细胞 MAPKs 信号通路

正常细胞在生物体中,需要增殖、分化、凋亡等生理过程来维持生物体内平衡^[60],但肿瘤细胞,如黑色素瘤细胞,会大幅提高增殖速度,同时细胞几乎不会凋亡,这样打破了生物体内平衡,严重的会影响生物体的正常发育生长。多年以来,许多研究证明了有许多不同的



信号通路影响着细胞的增殖、凋亡, 如MAPK信号通路、Hedgehog信号通路、TGF- β 信号通路、NF- κ B信号通路、Wnt/ β -catenin信号通路等等^[60]。对于大多数细胞来说, MAPK信号通路具有高度保守性, 从原核细胞到哺乳动物细胞均发现该通路在调控细胞增殖、分化、凋亡等过程起着极为重要的作用, 在探究肿瘤细胞的相关生理机制中, MAPK信号通路是被研究最多的激酶通路^[61]。

MAPKs是一类Ser/Thr蛋白激酶, 广泛存在于生物体内, 可以被炎症介质、生长因子或其他环境中的物理化学因子刺激而进入MAPK磷酸化联级反应 (phosphorylation cascade)。目前对于该联级反应的研究已经十分透彻^[60,62], 具体反应基本步骤如下:

- (1) 在胞内的信号蛋白, 与MAP激酶激酶的激酶 (MAPKKK/Raf) 结合并使其激活, 并使靶蛋白上的Ser/Thr残基磷酸化;
- (2) 活化后的Raf与MAP激酶的激酶 (MAPKK/Mek) 结合并使其Ser/Thr残基磷酸化;
- (3) Mek能激活MAPKs, MAPKs被磷酸化后进入细胞核, 可以使得细胞核内更多的底物蛋白的Ser/Thr残基磷酸化, 例如能够调节细胞增殖、分化和凋亡的特异性蛋白。

因此, 通过MAPK信号通路探究细胞增殖、凋亡是否受到影响, 十分重要的一个部分即是验证MAPKs是否最终被磷酸化。典型MAPK信号通路包括ERK (细胞外调节蛋白激酶, extracellular signal-regulated kinase)、JNK (c-Jun氨基末端激酶, c-Jun N-terminal kinase)、p38 (p38丝裂原活化蛋白激酶, p38 MAPK) 三条途径^[63], 这些对应的途径可以由不同的信号蛋白激活, 最终介导的具体的生物学效应也会有所不同^[64]: 其中ERK在控制细胞增殖分裂中发挥着重要作用, 抑制ERK磷酸化的药剂正在作为抗癌药进行研究; JNK途径是转录的关键, 其激活与诱发多种细胞的凋亡调控相关; p38途径会被炎症介质或环境因子激活, 可能导致人的哮喘和自身免疫性疾病, 在应激条件下的p38会参与细胞免疫调节、炎症反应以及细胞凋亡的过程。

MAPKs信号通路不仅仅在细胞活性调控中发挥作用, 许多研究认为, 在黑色素细胞中, MAPKs信号通路也影响着黑色素的合成^[65], 通过调控酪氨酸酶合成的相关上游基因, 影响着酪氨酸酶活性, 但是, 不同MAPKs途径对于黑色素含量的影响是不同的: 对于p38途径而言, 会活化MITF, 进而影响下游基因, 如TYR、TYRP-1和TYRP-2基因^[66], 诱导酪氨酸酶合成^[67]; 而对于JNK途径而言, 有研究发现, JNK途径抑制剂能够显著降低黑色素含量的生成, 通过进一步探究, 认为JNK途径抑制剂是通过抑制环磷腺苷效应元件结合蛋白 (cAMP-response element binding protein, CREB) 磷酸化, 从而导致MITF和酪氨酸酶的表达降低^[68]; ERK途径与前两者的正相关调控不同, ERK途径会导致MITF第73位Ser发生磷酸化^[69], 结构发生改变而抑制MITF的调控功能, 从而使得黑色素含量降低^[70]。

了解细胞的信号通路, 有助于推测rFIP-glu进行免疫调节和黑色素含量调节的过程, 在先前的研究中, 我们已经知道了在巨噬细胞RAW264.7中, rFIP-glu能够部分作用于MAPKs途径, 来发挥免疫调节的作用^[31]。

1.3 研究目的和意义

FIP-glu 作为灵芝中一种具有免疫调节、抗肿瘤、抗衰老等多种生物学活性的蛋白, 具有作为抗肿瘤药物原料、化妆品原料的价值, 在先前的研究中, 利用基因工程构建酵母工程菌, 具备大规模生产条件的rFIP-glu可以通过MAPK和PI3K信号通路在巨噬细胞RAW264.7内发挥免疫调节功能, 能够作用于MAPKs的部分途径, 并且基于rFIP-glu构建的糖基化突变体rFIP-glu N31S、rFIP-glu T36N和rFIP-glu N31S/T36N具有更佳的生物学活性和对巨噬细胞更低的毒性。在之前对FIP-glu的研究中, 鲜有对黑色素瘤细胞的研究, 虽然已有人证明其能降低黑色素瘤细胞的增殖活力, 但未有更深入的研究。

本研究利用 rFIP-glu N31S、rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N 三种 rFIP-glu，作用于小鼠黑色素瘤 B16 细胞，探究 rFIP-glu 对于 B16 细胞活力、凋亡的影响，再通过表达水平的研究，探究其是如何通过 MAPKs 途径来作用于 B16 细胞；同时，研究 rFIP-glu 对于 B16 细胞表达黑色素含量和酪氨酸酶活性的变化，来推测其对细胞功能的影响，同时通过 RT-qPCR 来验证。

通过本研究，可以了解 rFIP-glu 对于 B16 细胞增殖、凋亡的影响，可以为今后制备治疗黑色素瘤的药物提供理论基础，同时进一步探明具体通过 MAPKs 途径的作用机制；通过研究 rFIP-glu 对于 B16 细胞生产黑色素的影响，可以为 rFIP-glu 作为日用品原料在制作护肤品等产品时提供一定的参考价值。

1.4 研究内容和技术路线

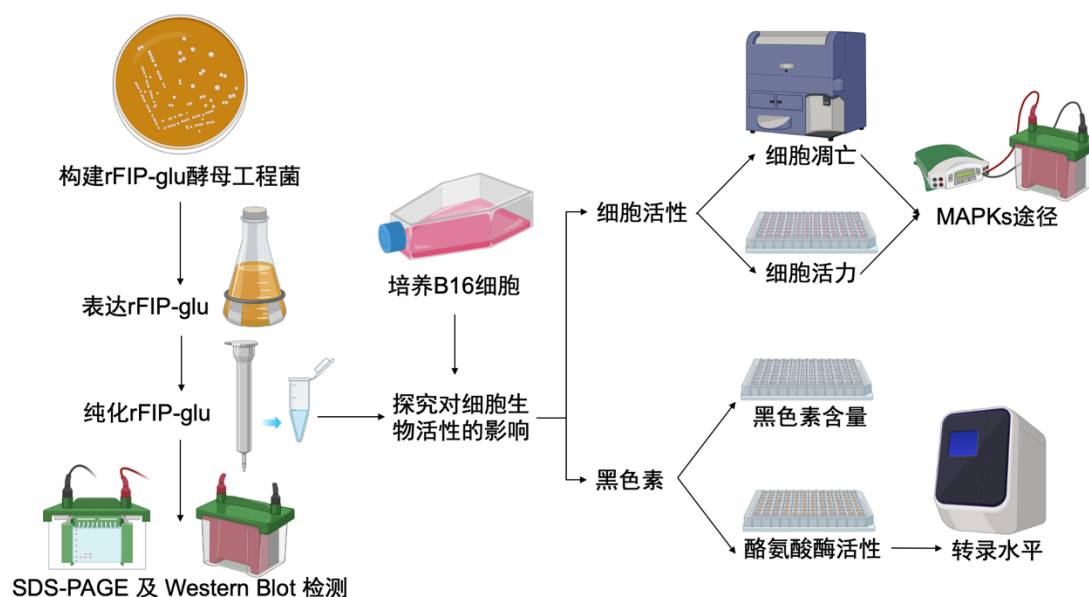


图 1-2 技术流程图

本研究的研究内容与技术路线如图 1-2 所示，具体描述如下：

- (1) 利用实验室保存的 pPIC9K::FIP-glu N31S、pPIC9K::FIP-glu T36N 和 pPIC9K::FIP-glu N31S/T36N 质粒，转入毕赤酵母 GS115，构建重组灵芝免疫调节蛋白 (rFIP-glu N31S、rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N) 工程菌；
- (2) 利用重组菌株表达生产 rFIP-glu，并用 Ni 柱亲和层析法分别纯化 rFIP-glu N31S、rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N；
- (3) 通过 SDS-PAGE 和 Western Blot 检测纯化后蛋白；
- (4) 培养小鼠黑色素瘤细胞 B16 细胞；
- (5) 使用 CCK-8 (Cell Counting Kit-8) 法和 AnnexinV/PI 双染法探究 rFIP-glu 对小鼠黑色素瘤细胞 B16 细胞细胞活力和凋亡的情况；
- (6) 探究 rFIP-glu 对诱导小鼠黑色素瘤细胞 B16 细胞增殖、凋亡在 MAPK 信号通路的作用；
- (7) 使用碱裂解法探究经过 rFIP-glu 处理后的 B16 细胞内黑色素含量，使用 L-Dopa 检测酪氨酸酶活性；
- (8) 探究 rFIP-glu 对 B16 细胞合成酪氨酸酶相关基因转录水平的影响。



第二章 实验材料及方法

2.1 实验材料

2.1.1 载体、菌株及细胞

重组质粒 pPIC9K::FIP-glu N31S、pPIC9K::FIP-glu T36N 和 pPIC9K::FIP-glu N31S/T36N, 组氨酸缺陷型毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115 均由本实验室保存, 小鼠黑色素瘤细胞 B16-F10 细胞来自复旦大学药学院。

2.1.2 试剂

(1) 购入试剂

酵母提取物, 蛋白胨, NaCl, 无水乙醇, 甲醇, 琼脂糖, 脱脂奶粉, 冰醋酸, 50% PEG, 10 mg/mL 变性鲑鱼精 DNA, Lyricas 溶壁酶, 2×TSINGKE Master Mix(blue), 250 bp DNA Ladder, His 标签蛋白琼脂糖纯化树脂, 过硫酸铵, TureColor 双色预染蛋白 Marker (宽范围), DMEM 高糖细胞培养基, PBS 缓冲液 (1×), 0.4 %台盼蓝染色液, 胰酶, 二氧化碳, 2×AceQ® Universal SYBR® qPCR Master Mix, RIPA 裂解液, PMSF (100mM), L-Dopa, Triton X-100。

(2) 自配试剂

LiCl 溶液: 称量 4.2 g LiCl 于 80 mL 去离子水 (deionized water, dH₂O) 中混匀, 定容至 100 mL, 过滤除菌, 4 °C 保存;

0.1M 磷酸钠缓冲液 (pH=7.4): 称量 1.10 g Na₂HPO₄ 和 0.27 g NaH₂PO₄ 于 80 mL dH₂O, 用磷酸和 NaOH 溶液调节 pH 至 7.4, 用 dH₂O 定容至 100 mL, 室温保存;

山梨醇 Buffer: 称取 21.86 g 山梨醇于 80 mL 0.1M 磷酸钠缓冲液 (pH=7.4) 中溶解, 用 0.1M 磷酸钠缓冲液 (pH=7.4) 定容至 100 mL, 室温保存;

50 × TAE: 称量 242 g Tris 和 37.2 g Na₂EDTA·2H₂O 溶于 800 mL dH₂O, 加入 57.1 mL 醋酸均匀, 定容至 1 L, 室温保存;

Lysis Buffer (pH=8.0): 称量 7.8 g NaH₂PO₄·2H₂O、17.54 g NaCl 和 0.68 g 咪唑 (imidazole) 于 800 mL dH₂O 均匀, 用磷酸和 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0, 定容至 1 L, 室温保存;

Wash Buffer (pH=8.0): 称量 7.8 g NaH₂PO₄·2H₂O、17.54 g NaCl 和 1.36 g 咪唑于 800 mL dH₂O 均匀, 用磷酸和 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0, 定容至 1 L, 室温保存;

Elution Buffer (pH=8.0): 称量 7.8 g NaH₂PO₄·2H₂O、17.54 g NaCl 和 17.0 g 咪唑于 800 mL dH₂O 均匀, 用磷酸和 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0, 定容至 1 L, 室温保存;

1 M Tris-HCl: 称量 121.1 g Tris 于 800 mL dH₂O 均匀, 用浓盐酸调节至所需 pH, 定容至 1 L, 高温高压灭菌, 室温保存;

SDS-PAGE Loading Buffer: 称量 0.5 g 十二烷基硫酸钠 (Sodium dodecyl sulfate, SDS) 和 25 mg 溴酚蓝 (Bromophenol blue, BPB) 于 10 mL 离心管中, 加入 1.25 mL 1 M Tris-HCl (pH=6.8) 和 2.5 mL 甘油, 用 dH₂O 定容至 5 mL 并充分混匀, 常温保存, 使用前加入 β-巯基乙醇 (2-Hydroxy-1-ethanethiol, 2-ME) 使得终浓度为 5 % (V/V);

10% DMSO 碱溶液: 10 % 体积 DMSO 使用 1 mol/L NaOH 溶液混匀, 现配现用;

5 × Tris-Glycine Buffer (SDS-PAGE 电泳缓冲液): 称量 15.1 g Tris、94 g 甘氨酸 (Glycine, Gly) 和 5.0 g SDS 于 800 mL dH₂O 混匀, 定容至 1 L, 室温保存;



考马斯亮蓝 R-250 染色液: 称量 1 g 考马斯亮蓝 R-250 于 250 mL 异丙醇溶解, 加入 100 mL 冰醋酸, 用 dH₂O 定容至 1 L, 滤纸过滤, 室温保存;

SDS-PAGE 脱色液: 量取 50 mL 无水乙醇和 100 mL 冰醋酸, 用 dH₂O 定容至 1 L, 室温保存;

10 % 过硫酸铵: 称量 1 g 过硫酸铵于 10 mL dH₂O 溶解, -20 °C 保存;

Western 转膜缓冲液: 称量 2.9 g Glycine、5.8 g Tris 和 0.37 g SDS 于 600 mL dH₂O 混匀, 定容至 800 mL, 加入 200 mL 的甲醇, 4 °C 保存;

TBST: 称量 8.8 g NaCl 于 800 mL dH₂O 混匀, 加入 20 mL 1 M Tris-HCl (pH=8.0) 和 0.5 mL 吐温-20 (Tween-20), 用 dH₂O 定容至 1 L, 室温保存;

(3) 试剂盒

表 1 所使用试剂盒名称及购入公司

名称	购入公司
AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kit	Axygen®
普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (离心柱型) (TIANGel Midi Purification Kit)	天根生化科技(北京)有限公司
酵母基因组 DNA 提取试剂盒 (TIANamp Yeast DNA Kit)	天根生化科技(北京)有限公司
TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit, 12% ECL 化学发光超敏显色试剂盒 (Super ECL Detection Reagent)	Bio-Rad Laboratories, Inc. 上海翊圣生物科技有限公司
CCK-8 试剂盒 (CCK-8 Cell Counting Kit)	南京诺唯赞生物科技有限公司
Annexin V-Alexa Fluor647/PI 细胞凋亡检测试剂盒	上海翊圣生物科技有限公司
培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒 (离心柱型) (RNAprep Pure Cell/Bacteria Kit)	天根生化科技(北京)有限公司
PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time)	宝日医生物技术(北京)有限公司
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司

2.1.3 培养基

LB 培养基: 1 % 酵母提取物, 2 % 蛋白胨, 1 % NaCl;

YPD 培养基: 1 % 酵母提取物, 2 % 蛋白胨, 2 % 葡萄糖;

BMGY 培养基: 1 % 酵母提取物, 2 % 蛋白胨, 1.34 % YNB, 1%生物素, 1%甘油, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液;

BMMY 培养基: 1%酵母提取物, 2 %蛋白胨, 1.34 %YNB, 1%生物素, 1%甲醇, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液;

细胞 DMEM 培养基: DMEM 高糖细胞培养基, 10%FBS, 1%双抗;

Cell Wash: DMEM 高糖细胞培养基, 2.5%FBS, 1%双抗, 10 mM 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid, Hepes), 100 µg/mL 庆大霉素;

细胞冻存液: 90% DMSO, 10% FBS。



2.1.3 抗体

表 2 所使用抗体详细信息

抗体名称	类型	来源	厂商
小鼠抗 6 × His 单克隆抗体	一抗	鼠	生工生物工程 (上海) 股份有限公司
Rabbit Anti-ERK1 + ERK2 抗体	一抗	兔	Abcam plc.
Anti-Erk1 (pT202/pY204) + Erk2 (pT185/pY187)抗体 [MAPK-YT]	一抗	鼠	Abcam plc.
Anti-JNK1+JNK2+JNK3 抗体 [EPR16797-211]	一抗	兔	Abcam plc.
Anti-JNK1 + JNK2 + JNK3 (phospho T183+T183+T221) 抗体[EPR5693]	一抗	兔	Abcam plc.
Anti-p38 (phospho T180 + Y182)抗体	一抗	兔	Abcam plc.
Anti-p38 抗体 [M138]	一抗	鼠	Abcam plc.
β-Actin 抗体	一抗	鼠	Affinity Biosciences
HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG	二抗	山羊	生工生物工程 (上海) 股份有限公司
山羊抗兔 IgG H&L (HRP)	二抗	山羊	Abcam plc.
山羊抗鼠 IgG H&L (HRP)	二抗	山羊	Abcam plc.

2.1.4 仪器

表 3 使用仪器列表

仪器	厂商	型号
PCR 仪	Eppendorf AG	6333
可见分光光度计	上海美普达仪器有限公司	PV1
超微量分光光度计	Thermo Fisher Scientific	NanoDrop One
基础电泳仪电源	韦克斯科技 (北京) 有限公司	EP300
多用途水平电泳槽	韦克斯科技 (北京) 有限公司	miniDNA
垂直电泳仪	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Mini PROTEIN® 525BR
湿转电转仪	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Mini Trans-Blot Cell
凝胶成像系统	上海勤翔科学仪器有限公司	GenoSens 1880
化学发光成像系统	Bio-Rad Laboratories, Inc.	ChemiDoc™ Touch
切胶仪	天根生化科技 (北京) 有限公司	OSE-470
高速离心机	Eppendorf AG	5407
微孔板迷你离心机	其林贝尔仪器制造有限公司	BE-6100
电子天平	奥豪斯仪器 (常州) 有限公司	AR224CN
	上海浦春计量仪器有限公司	JE3001
金属浴	美国赛洛捷克 (SCILOGEX)	HB150-62
	苏州海狸生物医学工程有限公司	2016C



续表 3

仪器	厂商	型号
电热恒温水浴锅	上海一恒科技有限公司	HWS24
超净工作台	上海沪粤明科学仪器有限公司	SW-CJ-1G
通风橱	上海智全控制设备有限公司	SHC-3000
生化培养箱	上海天呈实验仪器制造有限公司	DHP-9082
冰箱	海尔集团	BCD-275TMBC
微波炉	广东美的厨房电器制造有限公司	M1-L213B
冷冻干燥仪	Martin Christ	Alpha 1-2 LD
轨道摇床	Kylin-Bell Lab Instruments	ZD-9550
pH 计	上海越平科学仪器有限公司	PHS-3C
酶标仪	BioTek Instruments, Inc.	PowerWave XS
恒温振荡培养箱	苏州培英实验设备有限公司	THZ-C
	上海海向仪器设备厂	HX-2102C
二氧化碳培养箱	Thermo Electron LED GmbH	HERAcell vios 160i
倒置生物显微镜	重庆澳浦光电技术有限公司	DSZ2000X
流式细胞仪	Beckman Coulter Co.Ltd	Cytoflex
荧光定量 PCR 仪	Bio-Rad Laboratories, Inc.	CFX384 Touch

2.1.5 引物

所有引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 使用前将引物用 dH_2O 稀释为 100mM, 保存于 -20°C 冰箱中。

表 4 使用引物列表

引物名称	引物序列 (5'→3')
pPIC9K_F	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
pPIC9K_R	GCAAATGGCATTCTGACATCC
TYRP-1_F	CTGTGGATTATTGGGATGA
TYRP-1_R	GTGAGCCACCACTTTGAG
TYRP-2_F	GCTGATTAGTCGGAACCTCGA
TYRP-2_R	GGTTGGCAGTTTCTCATTATTT
TYR_F	CACCATGCTTTTGTGGACAG
TYR_R	GGCTTCTGGGTAAACTTCCAA
MITF_F	CAAATGGCAAATACGTTACCCG
MITF_R	CTCCCTTTTTATGTTGGGAAGGT
GAPDH_F	TATGTCGTGGAGTCTACTGGT
GAPDH_R	GAGTTGTCATATTTCTCGTGG



2.2 实验方法

2.2.1 重组灵芝免疫调节蛋白工程菌构建

2.2.1.1 重组质粒提取

将实验室保存在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 的重组质粒载体 pPIC9K::FIP-glu N31S、pPIC9K::FIP-glu T36N 和 pPIC9K::FIP-glu N31S/T36N 用 SDS 碱裂解法提取出, 用于下一步实验。具体使用 Axygen[®] AxyPrep[™] Plasmid Miniprep Kit, 并遵循其使用说明书操作。

试剂盒内含所需耗材 Miniprep column、2 mL Microfuge tube、1.5 mL Microfuge tube, 所需试剂 RNase A、Buffer S1、Buffer S2、Buffer S3、Buffer W1、Buffer W2 concentrate。

具体操作如下:

- (1) 取 4 mL 已经在 LB 培养基培养过夜的菌液, 高速离心机 12,000 $\times$ g 离心 1 min, 保留菌体沉淀;
- (2) 用 250 μ L Buffer S1 (已加入 RNase A) 重悬菌体后, 先加入 250 μ L Buffer S2, 上下缓慢颠倒数次, 再加入 350 μ L Buffer S3 后温和并充分的上下颠倒混匀, 12,000 $\times$ g 高速离心 10 min;
- (3) 将上清液转移至已装在 2 mL Microfuge tube 的 Miniprep column 中, 尽可能避免沉淀, 否则会降低质粒纯度, 12,000 $\times$ g 离心 1 min, 弃管中液体;
- (4) 往柱中加入 500 μ L Buffer W1, 12,000 $\times$ g 离心 1 min, 弃管中滤液;
- (5) 往柱中加入 700 μ L Buffer W2 (已加入无水乙醇), 12,000 $\times$ g 离心 1 min, 弃管中滤液, 并重复该步骤一次;
- (6) 再次 12,000 $\times$ g 离心 1 min, 并将 Miniprep column 转移至 1.5 mL Microfuge tube 中;
- (7) 往柱中滤膜加入 50 μ L 预热至 65 $^{\circ}$ C 的 dH₂O, 并在 65 $^{\circ}$ C 金属浴加热 1 min;
- (8) 12,000 $\times$ g 离心 2 min, 弃去 Miniprep column, -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存收集的重组质粒载体, 用于下一步操作。

2.2.1.2 重组表达载体线性化

将提取的 pPIC9K::FIP-glu N31S、pPIC9K::FIP-glu T36N 和 pPIC9K::FIP-glu N31S/T36N 重组质粒载体利用限制性内切酶 *Sac* I 于 37 $^{\circ}$ C 金属浴酶切 2h。体系如下:

Buffer	20 μ L
<i>Sac</i> I	5 μ L
重组质粒载体	80 μ L
dH ₂ O	95 μ L
总计	200 μ L

使用 TIANGel Midi Purification Kit 普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (离心柱型) 对酶切产物进行回收。试剂盒内含所需耗材吸附柱 CA2、收集管 (2 mL), 所需试剂平衡液 BL、溶胶液 PN、漂洗液 PW。具体操作如下:

- (1) 将 500 μ L 平衡液 BL 加到已放入收集管中的吸附柱 CA2 中 13,400 $\times$ g 离心 1 min 以进行柱平衡, 弃掉收集管中液体;
- (2) 向酶切产物加入等体积溶胶液 PN, 混匀后加入吸附柱 CA2 中, 室温静置 2 min 后, 13,400 $\times$ g 离心 1 min, 弃掉收集管中液体;
- (3) 向吸附柱 CA2 加入 600 μ L 漂洗液 PW (已加入无水乙醇), 13,400 $\times$ g 离心 1 min, 弃掉收集管中液体, 并重复一次;



- (4) 再次离心 $13,400 \times g$ 1 min, 去除柱内液体, 并室温晾干;
- (5) 吸附柱 CA2 转移至 1.5 mL 离心管, 加 50 μ L dH₂O 于吸附柱 CA2 膜中间, 室温放置 2 min 后 $13,400 \times g$ 离心 1 min, -20 °C 冰箱保存纯化后的线性化质粒载体, 用于下一步酵母转化实验。

2.2.1.3 酵母转化

将上一步得到的线性化重组质粒载体转入毕赤酵母中, 得到重组灵芝免疫调节蛋白 (rFIP-glu N31S、rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N) 工程菌。具体操作如下:

- (1) 将实验室保存的组氨酸缺陷型毕赤酵母 GS115 接种至装有 20 mL YPD 液体培养基的 100 mL 锥形瓶中, 于 28 °C 220 rpm 振荡恒温培养箱中培养, 培养至用可见分光光度计测量菌液 OD₆₀₀ 约为 1.0;
- (2) 转移至 50 mL 离心管, $1,500 \times g$ 离心 10 min 后去除培养基, 用 25 mL dH₂O 重悬后再次以 $1,500 \times g$ 离心 10 min, 去除液体后用 1 mL 100 mM LiCl 重悬菌体沉淀;
- (3) 转移至 2 mL 离心管, $13,400 \times g$ 离心 15 s 后去除液体;
- (4) 再次用 400 μ L 100 mM LiCl 重悬菌体沉淀, 吸取 50 μ L 至新的 1.5 mL 离心管, 离心去除液体;
- (5) 将 5 μ L 10 mg/mL 变性鲑鱼精 DNA 于 100 °C 金属浴加热 5 min 后, 迅速转移至冰上;
- (6) 依次向装有菌体沉淀的离心管中加入 240 μ L 50% PEG、36 μ L 100 mM LiCl、变性鲑鱼精 DNA 5 μ L 和 2.2.1.2 得到的线性化质粒载体 10 μ g, 并将细胞重悬, 室温静置 30 min;
- (7) 用 42 °C 金属浴热击 20 ~ 25 min;
- (8) 6,000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 并用 1 mL 无菌 dH₂O 重悬;
- (9) 取 300 μ L 重悬液涂布在 MD^{Kan} 固体培养基上, 于 30 °C 生化培养箱培养 2-4 天;
- (10) 挑取酵母单克隆至 20 mL YPD 液体培养基中振荡恒温培养 2-4 天, 得到的即为转化后的工程菌, 下一步将进行工程菌的鉴定;

2.2.1.4 酵母基因组 DNA 提取

将上一步得到的酵母菌收集, 提取其总 DNA, 以进行 PCR 鉴定, 确认重组质粒载体已进入酵母中。该过程使用 TIANamp Yeast DNA Kit 酵母基因组 DNA 提取试剂盒。试剂盒内含所需试剂缓冲液 GA、缓冲液 GB、缓冲液 GD、漂洗液 PW、Proteinase K, 含所需耗材吸附柱 CB3、收集管 (2 mL)。具体操作如下:

- (1) 将上一步得到的转化后的工程菌菌液加入 2 mL 离心管中, $13,400 \times g$ 离心 1 min 后去除培养基;
- (2) 使用 600 μ L 山梨醇 Buffer 重悬菌体, 并加入大约 50 U Lyticase 溶壁酶, 混匀后 30 °C 金属浴加热 30 min;
- (3) $1,500 \times g$ 离心 10 min, 弃上清并加入 200 μ L 缓冲液 GA 重悬沉淀;
- (4) 加入 20 μ L Proteinase K 和 220 μ L 缓冲液 GB, 充分混匀;
- (5) 将全部溶液和絮状物加入已放在收集管中的吸附柱 CB3, $13,400 \times g$ 离心 30 s, 弃掉收集管中废液;
- (6) 向柱中加入 500 μ L 缓冲液 GD (已加入无水乙醇), $13,400 \times g$ 离心 30 s, 弃掉收集管中废液;
- (7) 向柱中加入 600 μ L 漂洗液 PW (已加入无水乙醇), $13,400 \times g$ 离心 30 s, 弃掉收集



管中废液，并重复该步骤一次；

- (8) 离心 $13,400 \times g$ 2 min，将吸附柱 CB3 打开后室温晾干；
- (9) 将吸附柱 CB3 转移至新的 1.5 mL 离心管中，向柱中膜中央加 50 μ L dH₂O，室温放置 2 min 后 $13,400 \times g$ 离心 2 min，弃掉吸附柱 CB3；
- (10) 收集于离心管的酵母基因组 DNA 保存在 -20 °C 冰箱中。

2.2.1.5 PCR 鉴定

以提取工程菌的酵母基因组 DNA 作为模板，使用质粒载体上的特异性引物 pPIC9K_F 和 pPIC9K_R 进行扩增片段，在 0.2mL 薄壁离心管中按下表 PCR 体系混匀：

2×TSINGKE Master Mix (blue)	10 μ L
引物 pPIC9K-F	1 μ L
引物 pPIC9K-R	1 μ L
酵母基因组 DNA	1 μ L
dH ₂ O	7 μ L
总计	20 μ L

按照以下程序在 PCR 仪中反应：

94 °C	5 min	
94 °C	30 s	
55 °C	30 s	35×
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	

反应后的 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶在 $1 \times$ TAE 电泳缓冲液中电泳，使用 250 bp DNA Ladder 作为 DNA 分子量标准条带，条带分离后用凝胶成像仪拍照。

2.2.2 重组灵芝免疫调节蛋白表达及纯化

将 2.2.1 中转化得到的正确的重组灵芝免疫调节蛋白 (rFIP-glu N31S、rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N) 工程菌进行诱导分泌表达，收集并纯化表达的重组蛋白。

2.2.2.1 诱导表达 rFIP-glu

毕赤酵母工程菌为甲醇诱导型，使用含有甲醇的 BMMY 培养基进行诱导表达培养。

- (1) 将三个重组灵芝免疫调节蛋白工程菌分别接种至 BMGY 液体培养基，于 28 °C 220 rpm 振荡恒温培养箱中培养至菌液 OD₆₀₀ 约为 2~6；
- (2) 用高速离心机 $1,500 \times g$ 离心 5 min，去除培养基，并用 BMMY 液体培养基重悬，使得菌液 OD₆₀₀ 为 1.0，继续放入 28 °C 220 rpm 振荡恒温培养箱培养；
- (3) 每 24 h 向菌液中补加纯甲醇，使其终浓度为 1% (V/V)，总共培养 96 h；
- (4) 将菌液收集至 50 mL 离心管， $1,500 \times g$ 离心 10 min，收集上清液，即为粗蛋白液。

2.2.2.2 蛋白纯化

由于重组灵芝免疫调节蛋白上具有 His 标签，可以使用 His 标签蛋白琼脂糖纯化树脂对粗蛋白液进行纯化。

- (1) 将 100 mL 粗蛋白液加入透析袋 (3.5 kD，标准等级再生纤维素膜)，浸在 4 °C dH₂O



中透析彻夜;

- (2) 将透析后的粗蛋白液使用冷冻干燥机进行冻干, 去除全部液体, 将固体溶于 10-20 mL Lysis Buffer 中, 并 $13,400 \times g$ 离心 2 min;
- (3) 将 His 标签蛋白琼脂糖纯化树脂放入纯化柱中;
- (4) 使用纯化树脂的 5 倍体积 Lysis Buffer 进行柱平衡;
- (5) 将离心后的上清液温和上样至纯化柱中, 并收集流出液, 该过程重复 2-4 次;
- (6) 使用纯化树脂的 10 倍体积 Wash Buffer 洗脱杂蛋白;
- (7) 使用纯化树脂的 5 倍体积 Elution Buffer 进行洗脱, 并收集洗脱下来的纯蛋白液;
- (8) 使用纯化树脂的 5 倍体积对 His 标签蛋白琼脂糖纯化树脂及纯化柱进行清洗;
- (9) 将上述(2) - (8)步骤重复 1-3 次;
- (10) 使用纯化树脂的 10 倍体积 dH_2O 进行清洗, 并用 20 %乙醇保存纯化树脂;
- (11) 将收集的纯蛋白液用透析袋 $4^\circ C$ 透析彻夜, 并将透析后的蛋白液冻干;
- (12) 用 PBS 缓冲液将冻干后的固体溶解, 保存于 $-80^\circ C$ 冰箱中。

2.2.2.3 SDS-PAGE 电泳

使用 TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit (12%) 试剂盒配置 1 mm SDS-PAGE 胶, 来检测经过上述诱导表达并纯化后蛋白的分子量大小。试剂盒所含试剂有 Resolver A、Resolver B、Stacker A 和 Stacker B, 按照试剂盒说明书配置凝胶。具体步骤如下:

- (1) 将 3 mL Resolver A、3 mL Resolver B、3 μL TEMED 和 30 μL 10 %过硫酸铵混合, 加入 4 mL 混合液至 1 mm 蛋白胶板中;
- (2) 将 1 mL Stacker A、1 mL Stacker B、2 μL TEMED 和 10 μL 10 %过硫酸铵混合, 缓慢加入 2 mL 混合液至 1 mm 蛋白胶板上层, 并插入 10 孔制胶梳子, 室温静置 30 min;
- (3) 拔去制胶梳子, 安装至电泳槽中, 倒入 $1 \times$ SDS-PAGE 电泳缓冲液;
- (4) 在 1.5 mL 离心管中加入纯化后的重组灵芝免疫调节蛋白液 80 μL , 再加入 20 μL $5 \times$ SDS-PAGE Loading Buffer, 混匀后在金属浴 $100^\circ C$ 加热 5 min;
- (5) 待冷却后使用高速离心机瞬离, 混匀后将 10-20 μL 处理后的蛋白样品上样至 SDS-PAGE 胶, 使用 TureColor 双色预染蛋白 Marker 作为参照, 使用 200 V 电压电泳至 SDS-PAGE 胶底端;
- (6) 电泳结束后取出 SDS-PAGE 胶, 切去胶孔部分, 剩余部分可用与考马斯亮蓝染色或者进行 Western Blot;
- (7) 使用考马斯亮蓝 R-250 染色液染色 2-3 h, 取出后使用 SDS-PAGE 脱色液脱色至能肉眼看到清晰条带, 背景蓝色大部分去除, 使用凝胶成像仪进行拍照;

2.2.2.4 Western Blot

在进行 SDS-PAGE 电泳后, 可用特异性抗体与蛋白结合, 结合 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色结果确定蛋白是否为重组灵芝免疫调节蛋白 (rFIP-glu N31S、rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N)。本步骤使用一抗为小鼠抗 $6 \times$ His 单克隆抗体, 二抗为 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG。具体步骤如下:

- (1) 将除去胶孔的 SDS-PAGE 胶放入 Western 转膜缓冲液中;
- (2) 将 PVDF 膜浸在纯甲醇中激活 30 s 后, 放入;
- (3) 将两张转印滤纸放入 Western 转膜缓冲液中;
- (4) 从凝胶支架转印夹黑面开始, 依次放上纤维衬垫、转印滤纸、SDS-PAGE 胶、PVDF



膜、转印滤纸和纤维衬垫，夹上转印夹，放到已加入 Western 转膜缓冲液的湿转仪中，110V 电压运行 70 min；

- (5) 结束后，使用 TBST 在轨道摇床上清洗转印好的膜 10 min，重复三次；
- (6) 使用封闭液常温封闭 2 h；
- (7) 使用封闭液稀释一抗，4 °C 杂交过夜；
- (8) 使用 TBST 清洗膜 10 min，重复三次；
- (9) 使用 TBST 稀释二抗，室温杂交 2 h；
- (10) 使用 TBST 清洗膜 10 min，重复三次；
- (11) 使用 ECL 化学发光超敏显色试剂盒显色，将试剂盒中 A 液和 B 液按等体积混合后均匀加至膜表面，暗处反应 1 min 后放入化学发光成像系统中拍照。

2.2.2.5 Bradford 测定蛋白浓度

为了便于后续细胞功能实验，需要测定重组灵芝免疫调节蛋白浓度。使用 Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒，试剂盒包含 Bradford 试剂和 BSA 标准蛋白 (5 mg/mL)。具体步骤如下：

- (1) 使用 PBS 缓冲液稀释 BSA 标准蛋白 (5 mg/mL)，终浓度分别为 0、10、20、40、60、80、100、150 $\mu\text{g/mL}$ ，共 8 个梯度作为蛋白标准样品；
- (2) 将 20 μL 蛋白标准样品加入酶标板的孔中，每个浓度梯度做三个平行，加入 200 μL Bradford 试剂并充分混匀；
- (3) 将待测蛋白样品进行适当的稀释，使得终浓度在 10-150 $\mu\text{g/mL}$ 区间，加入 20 μL 稀释后的待测蛋白样品到酶标板的孔中，每个样品做三个平行，加入 200 μL Bradford 试剂并充分混匀；
- (4) 将酶标板放入酶标仪，测定 A595 处吸光值；
- (5) 根据蛋白标准样品对应吸光值建立标准曲线，并计算出待测蛋白样品蛋白浓度。

2.2.3 小鼠黑色素瘤细胞 B16 的培养

将液氮冻存的细胞复苏，并进行培养，为下一步探究重组灵芝免疫调节蛋白对 B16 细胞的影响做准备。

2.2.3.1 B16 细胞的复苏

B16 细胞保存于液氮中，需要将其恢复至正常生长状态。具体操作步骤如下，均在超净工作台或细胞房内操作：

- (1) 将培养基放置于 37 °C 水浴锅中预热后，吸取 4 mL 细胞 DMEM 培养基至新的 T25 细胞培养瓶；
- (2) 将 B16 细胞液氮冻存管从液氮取出后浸入 37 °C 水浴锅并晃动 2-3 min；
- (3) 将冻存管内细胞液转移至装有细胞 DMEM 培养基的培养瓶中，做好标记；
- (4) 将培养瓶放置于 37 °C、5 % CO_2 的二氧化碳培养箱中平放培养；
- (5) 使用倒置生物显微镜观察观察瓶内细胞，培养至细胞贴壁后，温和倒出瓶内液体，加入新鲜的 37 °C 预热细胞 DMEM 培养基，放入培养箱继续培养。

2.2.3.2 更换 B16 细胞培养基

B16 细胞培养一段时间后，由于营养物质减少、代谢产物增加，需要更换新鲜培养基来确保生长状态良好。一般情况下，B16 细胞培养需 1-2 天更换培养基，培养基颜色发黄时同样需要更换。具体操作为将培养瓶中旧培养基温和倒出，更换为新鲜的 37 °C 预热细胞

DMEM 培养基。

2.2.3.3 B16 细胞计数与传代培养

由于 B16 细胞为贴壁生长细胞，若生长过于密集，可能会影响细胞生长状态，此时需要进行传代培养，一般情况接种 B16 细胞数量为 1×10^5 个/mL 至新的培养瓶。细胞计数与传代培养具体操作如下：

- (1) 将 T25 培养瓶中的旧培养基温和倒出，用 PBS 缓冲液温和清洗细胞两次，加入 500 μ L 0.25 %胰酶润洗细胞，倒出后再加入 800 μ L 0.25 %胰酶，于 37 $^{\circ}$ C 二氧化碳培养箱中消化细胞，直至可以通过轻敲培养瓶使得细胞从瓶壁大面积掉落时，需终止消化，该过程约 2 min；
- (2) 向需终止消化的培养瓶中加入 3 mL Cell Wash，并将贴壁细胞全部吹打脱落，尽量避免气泡产生，之后将培养瓶中液体转移至新的无菌离心管中，高数离心机 1,300 rpm 离心 4 min；
- (3) 去除离心管中上层液体，保留细胞沉淀，使用 3 mL 细胞 DMEM 培养基均匀重悬细胞；
- (4) 细胞计数：取 50 μ L 均匀的细胞悬液于新的 1.5 mL 离心管中，再依次加入 400 μ L PBS 缓冲液和 50 μ L 0.4 %台盼蓝染色液，充分混匀后静置 3 min，再次充分混匀，使用细胞计数板进行细胞计数；
- (5) 用细胞 DMEM 培养基将细胞悬液稀释至 1×10^5 个/mL，取 5 mL 加入至新的 T25 培养瓶，放入二氧化碳培养箱继续培养，该浓度的细胞悬液也可以作为实验材料进行细胞接种实验。

2.2.3.4 B16 细胞接种

将浓度为 1×10^5 个/mL 的 B16 细胞悬液接种至合适的培养容器（如下表所示）中，于 37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂ 的二氧化碳培养箱培养 24 h 后可以用于后续细胞实验。

表 5 细胞培养容器对应培养体积

培养容器	体积
T25 培养瓶	5 mL
T75 培养瓶	15 mL
96 孔板	100 μ L/孔
12 孔板	500 μ L/孔
6 孔板	1 mL/孔

2.2.3.5 B16 细胞冻存

将 2.2.3.3 得到的细胞沉淀用细胞冻存液稀释至浓度为 1×10^6 个/mL，每个冻存管加入 1 mL 细胞悬液（细胞总数为 1×10^6 个），管上写好详细信息，将冻存管裹上棉花，-80 $^{\circ}$ C 冰箱过夜后移入液氮罐中冻存。

2.2.4 细胞毒性检测实验

探究重组灵芝免疫调节蛋白（rFIP-glu N31S、rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N）对



于小鼠黑色素瘤细胞 B16 的影响, 首先探究该重组蛋白是否会对 B16 细胞具有毒性。该步骤使用 CCK-8 Cell Counting Kit (CCK-8 试剂盒), 试剂盒含 CCK-8 Solution, 遵循说明书操作。具体操作如下:

- (1) 将 2.2.2 中得到三个重组灵芝免疫调节蛋白纯蛋白液用 PBS 缓冲液稀释到浓度为 $160\text{ }\mu\text{g/mL}$, 再分别用细胞 DMEM 培养基稀释至 $16\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的蛋白培养液, 再使用 PBS 缓冲液与细胞 DMEM 培养基按 1:9 体积混合后作为空白对照培养液;
- (2) 使用 2.2.3.4 接种并培养后的 96 孔板, 去除孔中培养基, 再分别加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ /孔三种蛋白培养液和空白对照培养液, 每种重组灵芝免疫调节蛋白和空白对照组均设置 6 个生物学重复, 即每种培养液放入 6 个孔;
- (3) 96 孔板盖上盖子, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\text{ }\%$ CO_2 的二氧化碳培养箱培养 24 h ;
- (4) 沿细胞板壁加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ /孔 CCK-8 Solution, 轻轻晃匀, 放回培养箱培养 $1\text{--}2\text{ h}$;
- (5) 使用酶标板测定 450 nm 处的吸光值。

2.2.5 细胞凋亡实验

观察在三种重组灵芝免疫调节蛋白(rFIP-glu N31S、rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N)处理下的 B16 细胞的形态是否有明显变化。首先先将重组蛋白与细胞反应, 操作如下:

- (1) 将 2.2.2 中得到三个重组灵芝免疫调节蛋白纯蛋白液用 PBS 缓冲液稀释到浓度为 $160\text{ }\mu\text{g/mL}$, 再分别用细胞 DMEM 培养基稀释至 $16\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的蛋白培养液, 再使用 PBS 缓冲液与细胞 DMEM 培养基按 1:9 体积混合后作为空白对照培养液;
- (2) 使用 2.2.3.4 接种并培养后的 6 孔板, 去除孔中培养基, 再分别加入 1 mL /孔三种蛋白培养液和空白对照培养液, 每种重组灵芝免疫调节蛋白和空白对照组均设置 2 个生物学重复, 即每种培养液放入 2 个孔, 放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\text{ }\%$ CO_2 的二氧化碳培养箱培养 24 h ;

接下来使用 AnnexinV/PI 双染法来检测 B16 细胞凋亡情况。

使用 Annexin V-Alexa Fluor647/PI 细胞凋亡检测试剂盒检测重组灵芝免疫调节蛋白对 B16 细胞的凋亡的影响, 可以区分细胞是早期凋亡还是晚期凋亡细胞。试剂盒内含试剂 Annexin V-Alexa Fluor647、PI Staining Solution ($20\text{ }\mu\text{g/mL}$) 和 $4\times$ Binding Buffer, 遵循说明书进行操作, 步骤如下:

- (1) 吸去培养液, 每孔加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ $0.25\text{ }\%$ 胰酶于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 消化细胞约 2 min , 直至倒置显微镜下观察细胞间隙加大, 可以轻易吹落细胞, 每孔加入 1 mL Cell Wash 收集细胞至 2 mL 离心管中, 高速离心机 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $300\times g$ 离心 5 min , 去掉上清;
- (2) 使用预冷的 PBS 缓冲液重悬细胞, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $300\times g$ 离心 5 min , 去掉上清, 该步骤重复一次;
- (3) 用无菌去离子水稀释 $4\times$ Binding Buffer 至 $1\times$ Binding Buffer;
- (4) 离心管加入 $250\text{ }\mu\text{L}$ $1\times$ Binding Buffer, 进行细胞计数, 调整浓度至 1×10^6 个/mL 细胞悬液;
- (5) 取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 稀释后的细胞悬液于 5 mL 流式管中, 加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ Annexin V-Alexa Fluor647 和 $10\text{ }\mu\text{L}$ PI Staining Solution, 轻轻混匀后, 放置于室温避光反应 15 min ;
- (6) 加入 $400\text{ }\mu\text{L}$ $1\times$ Binding Buffer, 混匀后样品送至上海交通大学生命科学技术学院流式细胞仪检测。仪器状态设置: 前向散射 FSC 与侧向散射 SSC 为线性放大, 荧光通道 FL1 和 FL2 对数放大, 每份样品检测 $20,000$ 个细胞, 得到数据后, 使用 Modfit 软件进行分析并作图, Annexin V-Alexa Fluor647 为横坐标, PI 为纵坐标。



2.2.6 B16 细胞黑色素含量测定

使用碱裂解法对 B16 细胞中的黑色素进行提取，并用分光光度计检测 B16 细胞黑色素含量。具体操作如下：

- (1) 将 2.2.2 中得到三个重组灵芝免疫调节蛋白纯蛋白液用 PBS 缓冲液稀释到浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ ，再分别用细胞 DMEM 培养基稀释至 10 $\mu\text{g/mL}$ 的蛋白培养液，再使用 PBS 缓冲液与细胞 DMEM 培养基按 1:9 体积混合后作为空白对照培养液；
- (2) 使用 2.2.3.4 接种并培养后的 6 孔板，去除孔中培养基，再分别加入 1 mL/孔三种蛋白培养液和空白对照培养液，每种重组灵芝免疫调节蛋白和空白对照组均设置 3 个生物学重复，即每种培养液放入 3 个孔，放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的二氧化碳培养箱培养 72h 后，去除培养基；
- (3) 每孔加入 200 μL 10% DMSO 碱溶液，充分混匀后转移至 1.5 mL 离心管中，于 80 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴加热 2 h；
- (4) 转移相同体积反应后液体至酶标板中，使用酶标仪测定 492 nm 下吸光值；
- (5) 以空白对照组为对照，计算实验组 B16 细胞中黑色素的相对含量，并作图。

2.2.7 B16 细胞酪氨酸酶活性测定

使用 L-Dopa 作为底物与被重组免疫调节蛋白处理后的细胞作用，测定其与空白对照组相对的酪氨酸酶活性差异。具体操作如下：

- (1) 将 2.2.2 中得到三个重组灵芝免疫调节蛋白纯蛋白液用 PBS 缓冲液稀释到浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ ，再分别用细胞 DMEM 培养基稀释至 10 $\mu\text{g/mL}$ 的蛋白培养液，再使用 PBS 缓冲液与细胞 DMEM 培养基按 1:9 体积混合后作为空白对照培养液；
- (2) 使用 2.2.3.4 接种并培养后的 12 孔板，去除孔中培养基，再分别加入 500 μL /孔三种蛋白培养液和空白对照培养液，每种重组灵芝免疫调节蛋白和空白对照组均设置 3 个生物学重复，即每种培养液放入 3 个孔，放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的二氧化碳培养箱培养 48 h 后，去除培养基；
- (3) 使用 PBS 缓冲液配置 1% Triton X-100 溶液，按 100 μL 每孔加入，并立即放入 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱低温冻存 30 min，取出后于室温融化，转移至 1.5 mL 离心管，4 $^{\circ}\text{C}$ 13,400 $\times g$ 离心 30 min，保留上清液；
- (4) 使用 PBS 缓冲液配置 2.5 mM 的 L-Dopa 溶液，按上清液和 L-Dopa 溶液体积比 4:1 混合，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴反应 1 h；
- (5) 按 100 μL /孔加入至酶标板中，使用酶标仪测定 492 nm 处的吸光值。

2.2.8 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

为了检测重组灵芝免疫调节蛋白(rFIP-glu N31S、rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N) 对于小鼠黑色素瘤细胞 B16 在生产黑色素时相关基因表达情况，先探究其转录水平，使用实时荧光定量 PCR 来确定其影响。

2.2.8.1 细胞 RNA 提取

该步骤使用 RNeasy Pure 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒来提取重组蛋白作用后的 B16 细胞，试剂盒含耗材 RNase-Free 吸附柱 CR3 (含 2 mL 收集管)、RNase-Free 过滤柱 CS (含 2 mL 收集管)、RNase-Free 离心管 (1.5 mL)，含试剂裂解液 RL、去蛋白液 RW1、漂洗液 RW、无 RNA 酶双蒸水 (RNase-Free ddH₂O)、DNase I (1500 U)、RDD 缓冲液，遵循试剂盒说明书进行操作，所有使用到的额外耗材，如枪头均为 RNase-Free。具体操作如下：

- (1) 将 2.2.2 中得到三个重组灵芝免疫调节蛋白纯蛋白液用 PBS 缓冲液稀释到浓度为



- 480 $\mu\text{g/mL}$ ，再分别用细胞 DMEM 培养基稀释至 48 $\mu\text{g/mL}$ 的蛋白培养液，再使用 PBS 缓冲液与细胞 DMEM 培养基按 1:9 体积混合后作为空白对照培养液；
- (2) 使用 2.2.3.4 接种并培养后的 12 孔板，去除孔中培养基，再分别加入 500 μL /孔三种蛋白培养液和空白对照培养液，每种重组灵芝免疫调节蛋白和空白对照组均设置 3 个生物学重复，即每种培养液放入 3 个孔，放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO_2 的二氧化碳培养箱培养；
 - (3) 6 h 后，吸弃 12 孔板中培养液，每个孔加入 350 μL 裂解液 RL（已加入 1 % β -巯基乙醇）。并反复吹打，使细胞从壁上脱落并裂解，将裂解后的溶液全部转移至 RNase-Free 过滤柱 CS（装在 2 mL 收集管中），高速离心机 13,400 $\times g$ 离心 2 min；
 - (4) 往收集管中滤液加入 350 μL 70 % 乙醇，混匀后全部转移至 RNase-Free 吸附柱 CR3（装在 2 mL 收集管中），13,400 $\times g$ 离心 1 min，弃收集管中滤液；
 - (5) 向柱中加入 350 μL 去蛋白液 RW1，13,400 $\times g$ 离心 1 min，弃收集管中滤液；
 - (6) 将 DNase I (1500 U) 充分溶解于 550 μL RNase-Free ddH₂O 中配制成 DNase I 储存液，按 DNase I 储存液与 RDD 缓冲液体积比 1:7 配制 DNase I 工作液；
 - (7) 向吸附柱 CR3 中间滤膜滴加 80 μL DNase I 工作液，室温放置 15 min；
 - (8) 向柱中加入 350 μL 去蛋白液 RW1，13,400 $\times g$ 离心 1 min，弃收集管中滤液；
 - (9) 向柱中加入 500 μL 漂洗液 RW（已加入 4 倍体积无水乙醇），13,400 $\times g$ 离心 1 min，弃收集管中滤液，重复该步骤一次；
 - (10) 13,400 $\times g$ 离心 2 min，打开吸附柱 CR3 于室温晾数分钟，将吸附柱 CR3 移至 1.5 mL RNase-Free 离心管，向柱中滤膜加入 50 μL RNase-Free ddH₂O，室温放置 2 min，13,400 $\times g$ 离心 2 min，得到细胞总 RNA 溶液，保存在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中，一周内进行下一步实验；
 - (11) 提取的总 RNA 上样至 1 % 琼脂糖凝胶，置于 1 $\times$ TAE 电泳缓冲液中，进行低电压水平电泳，一般设置为小于 100 V 电压，条带分离后用凝胶成像仪拍照；
 - (12) 使用超微量分光光度计检测 RNA 浓度。

2.2.8.2 cDNA 获取

将 RNA 反转录成 cDNA 文库，便于下一步检测 B16 细胞黑色素表达相关基因的转录表达水平。该步骤使用 PrimeScriptTMRT Master Mix (Perfect Real Time) 试剂盒，试剂盒内含所需试剂 5 $\times$ PrimeScript RT Master Mix 和 RNase-Free dH₂O，按照下列反应体系加到 RNase-Free 0.2 mL 薄壁离心管。

5 $\times$ PrimeScript RT Master Mix	4 μL
RNA	1 μg
RNase-Free dH ₂ O	补加至 20 μL
总计	20 μL

按照以下程序在 PCR 仪中反应：

反转录反应	37 $^{\circ}\text{C}$	15 min
反转录酶的失活反应	85 $^{\circ}\text{C}$	5 s
	4 $^{\circ}\text{C}$	10 min

反应结束后，将反转录后的 cDNA 文库保存在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中，用于下一步实验。

2.2.8.3 实时荧光定量 PCR

B16 细胞黑色素合成相关基因的引物对 cDNA 文库中相关基因含量进行定量检测，共定量检测 *TRYP-1*、*TRYP-2*、*TYR* 和 *MITF* 四种基因表达量，使用 *GAPDH* 作为内参基因。该步骤操作时注意避光，所用引物参照 2.1.5，按下表体系加入 384 孔板中：

2 × AceQ® Universal SYBR® qPCR Master Mix	5 μL
引物 F	0.2 μL
引物 R	0.2 μL
cDNA 模板	2 μL
dH ₂ O	2.6 μL
总计	20 μL

使用微孔板迷你离心机将所加溶液混匀并离心至孔底端，放入荧光定量 PCR 仪，按以下程序运行：

预变性	95 °C	5 min	
循环反应	95 °C	10 s	40 ×
	60 °C	30 s	
融解曲线	95 °C	10 min	
	95 °C	5 s	
	65 °C	5 s	
	95 °C	10 min	

得到数据后使用 2^{-ΔΔCt} 法计算基因表达量，并使用 Prism 8 软件作图。

2.2.9 Western Blot 分析

进行重组灵芝免疫调节蛋白（rFIP-glu N31S、rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N）对 B16 细胞黑色素表达相关基因的转录表达水平分析后，再从翻译表达水平验证该重组蛋白是否对 B16 细胞有影响，使用 Western Blot 对 B16 细胞黑色素合成表达通路中的相关蛋白进行检测。

2.2.9.1 细胞总蛋白质提取

首先需要将经过重组灵芝免疫调节蛋白处理后的 B16 细胞总蛋白提取，前期细胞培养与给药步骤与提取细胞 RNA 相似，参照 2.2.8.1 步骤 (1) 和 (2)，为避免蛋白降解，以下所有步骤需在冰上进行：

- (1) 培养 24 h 后去除培养基，使用预冷的 500 μL PBS 缓冲液清洗细胞一次，每孔加入 100 μL RIPA 裂解液（使用前加入 PMSF 使其终浓度为 1 mM），将细胞吹打脱落并与裂解液充分接触；
- (2) 充分裂解后，将所有液体转移至 1.5 mL 离心管中 4 °C 13,400 × g 离心 5 min，取上清细胞总蛋白液，可用于下一步实验，蛋白样品保存于 -80 °C 冰箱中。

2.2.9.2 BCA 法测定蛋白浓度

由于 RIPA 裂解液中存在去垢剂，不能使用 Bradford 法测定蛋白浓度，因此需要使用 BCA 法测定蛋白浓度，该步骤使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒，包含试剂 BCA 试剂 A、BCA 试剂 B、蛋白标准 (BSA) 和蛋白标准配置液，遵循说明书操作，需注意防止蛋白样品过热



降解。具体操作如下：

- (1) 使用蛋白标准配置液稀释蛋白标准品至 25 mg/mL，再使用 PBS 缓冲液稀释，终浓度分别为 0、1、2、4、8、12、16、20 mg/mL，共 8 个梯度作为蛋白标准样品；
- (2) 按 BCA 试剂 A 和 BCA 试剂 B 50:1 体积比配置 BCA 工作液；
- (3) 将 20 μ L 蛋白标准样品和待测样品分别加入酶标板的孔中，每个样品做三个平行，加入 200 μ L BCA 工作液混匀，于 37 $^{\circ}$ C 放置 2 个小时。
- (4) 将酶标板放入酶标仪，测定 A562 处吸光值；
- (5) 根据机器读取的蛋白标准样品对应 A562 处吸光值，建立标准曲线并计算出待测蛋白样品的蛋白浓度。

根据蛋白样品浓度，使用 PBS 缓冲液将每个实验组和对照组的 B16 细胞总蛋白浓度稀释到相同浓度，便于进行之后的定量实验。

2.2.9.3 Western Blot

为了检测所提取的 B16 细胞总蛋白中通路蛋白的含量，可以借助 Western Blot 在 PVDF 膜上特异性显示特定的蛋白，来比较经过重组灵芝免疫调节蛋白处理后，相关通路蛋白的表达水平是否有差异。具体操作可参考 2.2.2.4 的 Western Blot 鉴定重组灵芝免疫调节蛋白的操作步骤，使用的抗体如下表所示：

表 6 不同通路蛋白对应使用的抗体

通路蛋白名称	一抗	二抗
p-p38	Anti-p38 (phospho T180 + Y182)抗体	山羊抗兔 IgG H&L (HRP)
p38	Anti-p38 抗体[M138]	山羊抗鼠 IgG H&L (HRP)
p-ERK	Anti-Erk1 (pT202/pY204) + Erk2 (pT185/pY187)抗体[MAPK-YT]	山羊抗鼠 IgG H&L (HRP)
ERK	Rabbit Anti-ERK1 + ERK2 抗体	山羊抗兔 IgG H&L (HRP)
p-JNK	Anti-JNK1 + JNK2 + JNK3 (phospho T183+T183+T221)抗体[EPR5693]	山羊抗兔 IgG H&L (HRP)
JNK	Anti-JNK1+JNK2+JNK3 抗体[EPR16797-211]	山羊抗兔 IgG H&L (HRP)
β -Actin	β -Actin 抗体	山羊抗鼠 IgG H&L (HRP)

2.2.9.4 Western Blot 图像数据化分析

使用化学发光成像系统拍照后，使用仪器配套软件 Bio-Rad Image Lab 6.0.1 对图像进行分析，扣除背景后，对通路蛋白条带总体积进行计算。得到数据后作图，并分析实验组与空白对照组的差异。



第三章 结果与分析

3.1 重组灵芝免疫调节蛋白的获得

将实验室已有的重组灵芝免疫调节蛋白 (rFIP-glu N31S、rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N) 质粒载体分别转化至毕赤酵母 GS115, 经过酵母基因组 DNA 提取, 并用载体上的特异性引物进行 PCR 鉴定, 三种酵母转化子两个引物间碱基对 (base pair, bp) 理论值应为 847 bp。得到琼脂糖凝胶电泳图如图 3-1, 三种酵母转化子在 800-900 bp 附近有条带, 而理论值为 847 bp, 与预期一致, 可初步判断重组质粒已转入酵母中。

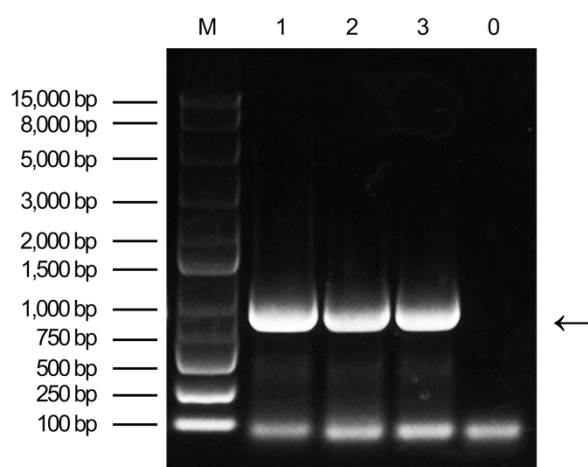


图 3-1 构建 rFIP-glu 酵母转化子 PCR 鉴定结果图

泳道 M: DNA Ladder, 泳道 1: rFIP-glu N31S 酵母转化子 DNA, 泳道 2: rFIP-glu T36N 酵母转化子 DNA, 泳道 3: rFIP-glu N31S/T36N 酵母转化子 DNA, 泳道 0: 阴性对照。

使用甲醇型诱导培养基培养转化后的酵母转化子, 得到分泌蛋白经过纯化, 使用 SDS-PAGE 对纯化后的蛋白进行鉴定, 结果如图 3-2 (a), rFIP-glu N31S 有一条条带, 而 rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N 有两条条带。在先前的研究中, 报道了经过糖基化的蛋白在毕赤酵母 GS115 中诱导表达会出现糖基化不均一的现象^[71,72], Zhou 等人利用毕赤酵母 GS115 表达来源于树舌灵芝 (*Ganoderma applanatum*) 的 rFIP-gap1 和 rFIP-gap2 也同样在胶图中观察到了多个条带^[73]。在我们先前的研究中认为 rFIP-glu N31S 的糖基化程度不如其他二者, 在 SDS-PAGE 胶图上仅有一条在 15 kDa 左右的条带, 而 rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N 除了有一条与 rFIP-glu N31S 相同大小的条带外, 在约 18 kDa 处也有一条条带^[20], 本试验结果与预期相符, 可初步认为图 3-2 (a) 的泳道 2 和泳道 3 中两个条带均为目标蛋白。同时, 利用 Western Blot 的方法, 由于目标蛋白上拥有 His 标签, 用能与蛋白 His 标签结合的一抗抗体检测蛋白, 如图 3-2 (b) 所示, 与 SDS-PAGE 结果一致, rFIP-glu N31S 有一条条带, 而 rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N 有两条条带。可以认为该酵母转化子表达并纯化后的蛋白为所需的目的蛋白 rFIP-glu N31S、rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N。

确认蛋白为所需的目的蛋白后, 大量诱导表达纯化重组蛋白, 用于下一步实验。

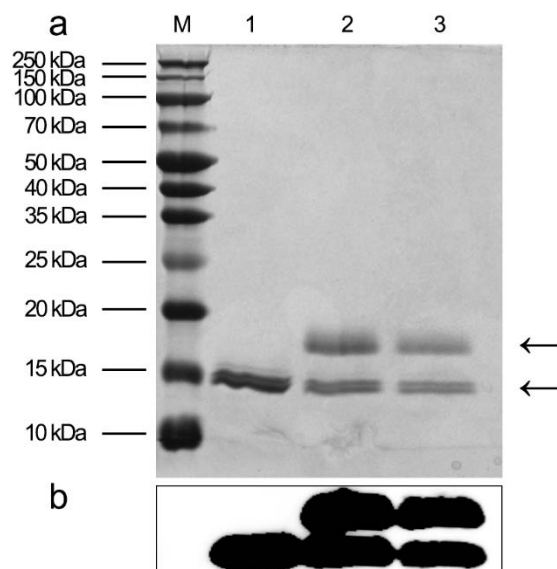


图 3-2 纯化后 rFIP-glu 鉴定

(a) SDS-PAGE 图; (b) Western Blot

泳道 M: 蛋白 Marker, 泳道 1: rFIP-glu N31S, 泳道 2: rFIP-glu T36N, 泳道 3: rFIP-glu N31S/T36N.

3.2 rFIP-glu 对 B16 细胞活性的影响

在先前的研究中, 表明灵芝免疫调节蛋白对巨噬细胞 RAW264.7 生长具有显著的抑制作用^[19,26], 并且进一步发现其激活了细胞的免疫调节途径^[31]. 为了研究该重组灵芝免疫调节蛋白是否对 B16 细胞具有生物学作用, 先探究该蛋白对于 B16 细胞活力是否具有显著影响。

3.2.1 rFIP-glu 对细胞活力的影响

本研究中, 为了探究该 rFIP-glu 对于 B16 细胞活性的影响, 在 16 $\mu\text{g/mL}$ 的蛋白浓度下评估对 B16 细胞的毒性。结果如图 3-3 所示, 经过 rFIP-glu N31S、rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N 处理后的 B16 细胞活力, 均极显著地低于空白对照 ($p \leq 0.0001$), 约为 60%。说明这些蛋白均具有极显著的抑制 B16 细胞的活力, 可以推测具有减少瘤细胞增殖、促进凋亡的能力, 需要下一步继续验证。

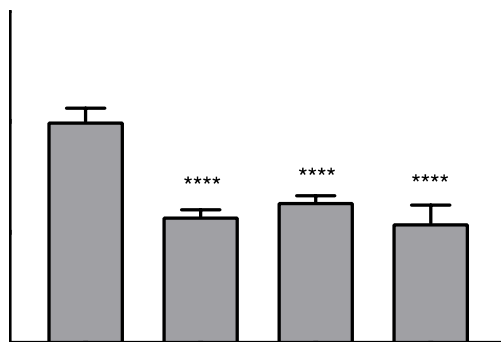


图 3-3 rFIP-glu 对 B16 细胞活力的影响

数据表示为 means $\pm$ SD (n = 6). 与空白对照组相比, ****, $p \leq 0.0001$.



3.2.2 rFIP-glu 对细胞凋亡的影响

得到了初步结果后使用 Annexin/PI 双染法检测进一步检测 B16 细胞的凋亡情况, 进一步验证 rFIP-glu 对于 B16 细胞活性的影响。使用的 Annexin V-Alexa Fluor647/PI 细胞凋亡检测试剂盒中包含了利用 Alexa Fluor647 标记的 Annexin V (膜联蛋白-V) 试剂, Annexin V 是一种二价钙离子依赖性的磷脂结合蛋白, 可以与早期凋亡细胞的细胞膜外表面的磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 高亲和地结合, 通过流式细胞仪可以检测 Alexa Fluor647 标记, 以分析早期凋亡细胞的数量。另外, 试剂盒中的碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 试剂可以区分存活早期和晚期凋亡的细胞, PI 试剂可以透过凋亡晚期和坏死细胞的细胞膜, 与细胞核中的核酸结合而呈红色。因此 Annexin V 与 PI 联用, 可以区分活细胞 (Annexin V 阴性/PI 阴性)、早期凋亡细胞 (Annexin V 阳性/PI 阴性) 和晚期凋亡细胞与坏死细胞 (Annexin V 阳性/PI 阳性)。

经过流式细胞仪检测后, 经过软件作图后的结果如图 3-4, PI 为纵坐标, Annexin V-Alexa Fluor647 为横坐标, 左下象限为 Annexin V 阴性/PI 阴性, 即为活细胞, 右上象限为 Annexin V 阳性/PI 阳性, 即为晚期凋亡细胞与坏死细胞。如图可知, 经过 rFIP-glu N31S、rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N 处理后的 B16 细胞, 细胞在右上象限数量占总量分别为 47.99%、44.71% 和 48.30%, 相较于空白对照的 2.69% 晚期凋亡与坏死细胞有明显的增多, 右下象限表示的早期凋亡细胞数量也略多于空白对照。说明 rFIP-glu 促进了 B16 细胞的早期凋亡, 也促进了细胞的坏死和晚期凋亡, 抑制了 B16 细胞的活力。

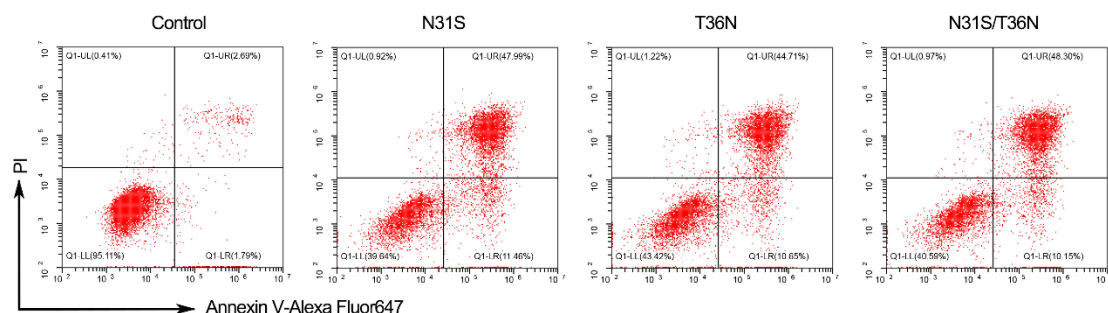


图 3-4 rFIP-glu 对 B16 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测经过处理后 B16 细胞, AnnexinV/PI 双染结果。

以上结果均表明了三种 rFIP-glu 对 B16 细胞具有一定的毒性, 抑制细胞的活性, 促进细胞凋亡和坏死。说明 rFIP-glu 对于 B16 细胞的生长有影响^[74], 可以进一步探究 rFIP-glu 是如何通过 MAPKs 途径对 B16 细胞的增殖、凋亡环节产生影响的。

3.3 rFIP-glu 对 B16 细胞 MAPKs 信号通路的翻译水平影响

通过 Western Blot 方法检测从经过 48 μ g/mL rFIP-glu 培养的 B16 细胞提取的总蛋白, 使用不同蛋白对应的特异性一抗抗体, 最终可以在 PVDF 膜上分辨出清晰的蛋白条带。本研究所使用的 6 种一抗抗体能分别检测出 p38、ERK 和 JNK 蛋白以及对应的磷酸化蛋白 p-p38、p-ERK 和 p-JNK, 均为 MAPKs 家族蛋白, 同时使用 β -actin 作为内参。使用软件分析条带体积 (双条带同时计算), 并计算磷酸化蛋白和非磷酸化蛋白的比值, 与空白对照进行对比。结果如图 3-5 (b)(c)(d) 所示: 在 p38 途径下, rFIP-glu T36N 处理后 B16 细胞的 p38

相较空白对照磷酸化程度上升, 存在差异, rFIP-glu N31S 处理后 p38 磷酸化程度与空白对照相比没有差异, 而经过 rFIP-glu N31S/T36N 处理, p38 磷酸化程度略有下降, 存在差异但不显著, 三个蛋白处理结果不尽相同, 并且误差线也较大; 在 ERK 途径下, 三个蛋白处理 B16 细胞后 ERK 磷酸化的比值下降, 并且相较于空白对照, 都具有极显著的差异性; 而在 JNK 途径下, 三个蛋白处理后, JNK 的磷酸化程度也均有下降, 但 rFIP-glu T36N 处理后的 p-JNK/JNK 的值相较于空白对照差异显著性不如另外二者, 总体来说差异不大。

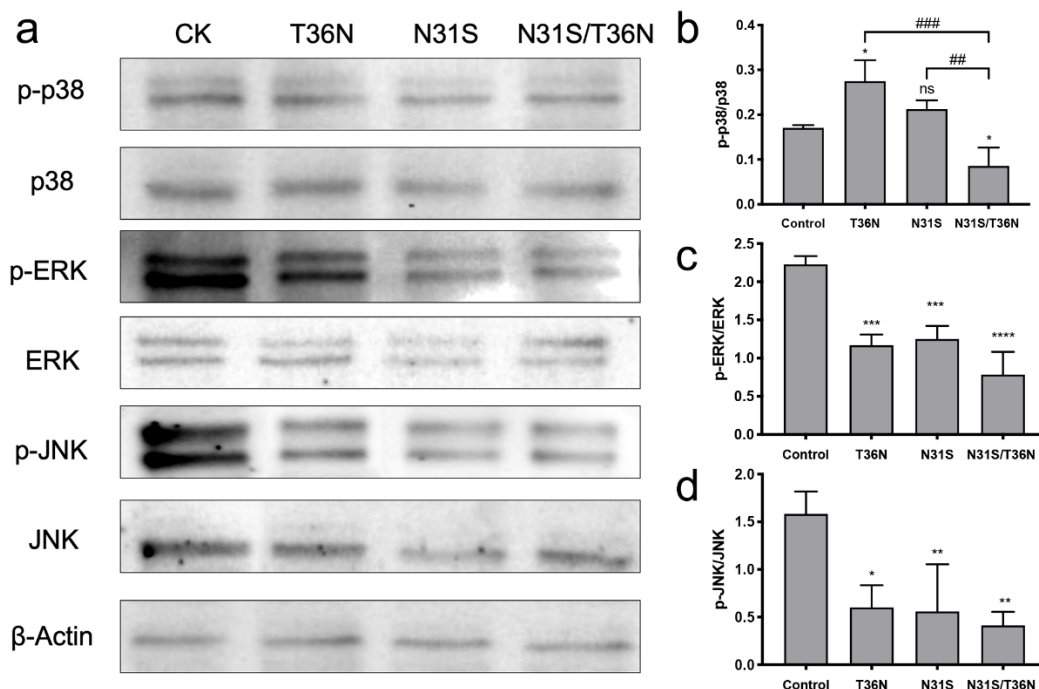


图 3-5 rFIP-glu 对 B16 细胞 MAPKs 信号通路的翻译水平影响

(a) Western Blot 图, (b) p-p38/p38 比值, (c) p-ERK/ERK 比值, (d) p-JNK/JNK 比值。

数据表示为 means $\pm$ SD ($n = 3$). 与空白对照组相比, ns, $p > 0.05$; *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$. 两组实验组相比, ##, $p \leq 0.01$; ###, $p \leq 0.001$.

由结果可以看出, 三种 rFIP-glu 对于 p38 途径表现出不稳定性, 误差较大, 并且相互之间结果具有显著差异, 推测 rFIP-glu 对 p38 途径影响有限; 三种 rFIP-glu 对 JNK 途径有一定的抑制作用, p-JNK 含量降低, 但差异不是极为显著; 而对于 ERK 途径, rFIP-glu 均对其磷酸化有极显著的抑制, 推测 rFIP-glu 主要是通过 MAPK 信号通路的 ERK 途径进行对 B16 细胞的免疫调节活动。综上所述, rFIP-glu 对 B16 细胞 MAPK 信号通路的不同途径影响由大到小为 ERK 途径 > JNK 途径 > p38 途径。

3.4 rFIP-glu 对 B16 细胞内黑色素含量的影响

黑色素细胞能够在体内分泌黑色素, 黑色素决定着动物的体色、毛色, 也起到保护皮肤免受紫外线伤害的作用^[75,76]。此外, 黑色素细胞分泌黑色素的含量能反应其生长的特性, 本研究继续使用三种 rFIP-glu 以 $10 \mu\text{g/mL}$ 的浓度处理 B16 细胞, 并提取培养后细胞生产的黑色素含量与空白对照进行对比。

试验结果如图 3-6 所示, 经过 rFIP-glu N31S、rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N 处理后的 B16 细胞生产的黑色素均极其显著 ($p \leq 0.0001$) 高于空白对照, 分别约为空白对照

的 1.8 倍、1.6 倍和 1.9 倍，三者中 rFIP-glu T36N 产生的影响最低，相较于 rFIP-glu N31S 有差异，相较于 rFIP-glu N31S/T36N 有显著差异。

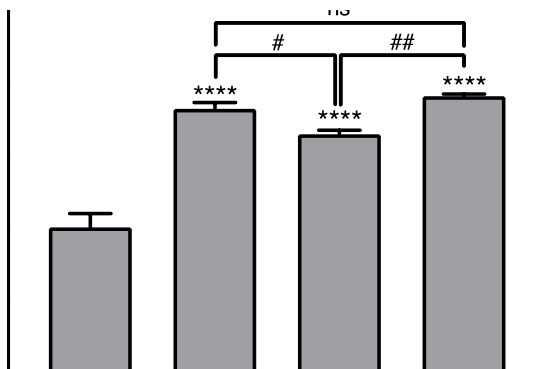


图 3-6 rFIP-glu 对 B16 内黑色素含量的影响

数据表示为 means $\pm$ SD (n = 3). 与空白对照组相比, ****, $p \leq 0.0001$. 两个实验组之间相比, ns, $p > 0.05$; #, $p \leq 0.05$; ##, $p \leq 0.01$.

数据结果表明, rFIP-glu 在 10 μ g/mL 浓度下能显著的提升 B16 细胞分泌黑色素的含量。

3.5 rFIP-glu 对 B16 细胞内酪氨酸酶活性的影响

酪氨酸酶作为黑色素细胞内合成黑色素的重要酶之一, 其含量也同样作为 B16 细胞生长特性的指标, 本研究使用三种 rFIP-glu 在 10 μ g/mL 的浓度下, 处理 B16 细胞 72 h 后, 对比细胞内合成的酪氨酸酶的活力。

结果如图 3-7 所示, 相较于空白对照, rFIP-glu N31S 极显著 ($p \leq 0.001$) 地提高了酪氨酸酶的活力, rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N 与空白对照的 B16 细胞的酪氨酸酶活力有显著差异 ($p \leq 0.01$)。

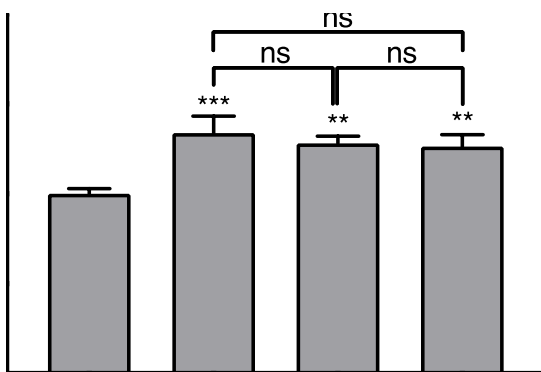


图 3-7 rFIP-glu 对 B16 细胞内酪氨酸酶活力的影响

数据表示为 means $\pm$ SD (n = 3). 与空白对照组相比, **, $p \leq 0.01$, ***, $p \leq 0.001$. 两个实验组之间相比, ns, $p > 0.05$.

结果表明, 三种蛋白均能提高 B16 细胞内酪氨酸酶的活力, 与之前试验得到的 rFIP-glu 能提高黑色素生产的结果相对应, 但三者之间的酪氨酸酶活力没有显著差别。下一步通过

RT-qPCR 来进一步验证酪氨酸酶合成相关基因的转录水平, 进一步探究 rFIP-glu 是如何影响 B16 细胞合成黑色素的。

3.6 rFIP-glu 对 B16 细胞合成黑色素转录水平的影响

使用 *TYRP-1*、*TYRP-2*、*TYR* 和 *MITF* 基因的引物对使用经过 48 $\mu\text{g/mL}$ rFIP-glu N31S、rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N 分别处理 B16 细胞所提取的总 RNA 进行 RT-qPCR 检测, 探究在转录水平的基因表达量。其中最重要的酪氨酸酶表达量如图 3-8 (a) 所示, 三个 rFIP-glu 处理 B16 细胞后, *TYR* 基因表达量均相较于空白对照具有极显著差异, 且相互之间无差异, 与之前酪氨酸酶活性的结果吻合; 其次是三者的 *TYRP-1* 和 *TYRP-2* 基因的表达, *TYRP-1* 和 *TYRP-2* 作为黑色素中真黑素合成的支路, 能加速多巴色素变成真黑素的氧化过程, 结果如 3-8 (b)(c) 所示, 三个 rFIP-glu 均促进了 *TYRP-1* 和 *TYRP-2* 基因的表达, 其中 rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N 对转录水平的提升比较高, 相较于空白对照, 极显著提升了 *TYRP-1* 表达, 显著提升了 *TYRP-1* 表达, 但 rFIP-glu N31S 对于 *TYRP-1* 和 *TYRP-2* 基因转录提升的水平不如其他二者高, 仅分别为显著差异和有差异。总之, 通过上述分析, 可以知道 rFIP-glu 能提高 B16 细胞生产黑色素的量和酪氨酸酶活性, 是因为其酪氨酸酶表达量大幅提升, 并且由 *TYRP-1* 和 *TYRP-2* 催化多巴色素变成真黑素的途径也加速, 导致了黑色素含量增加。

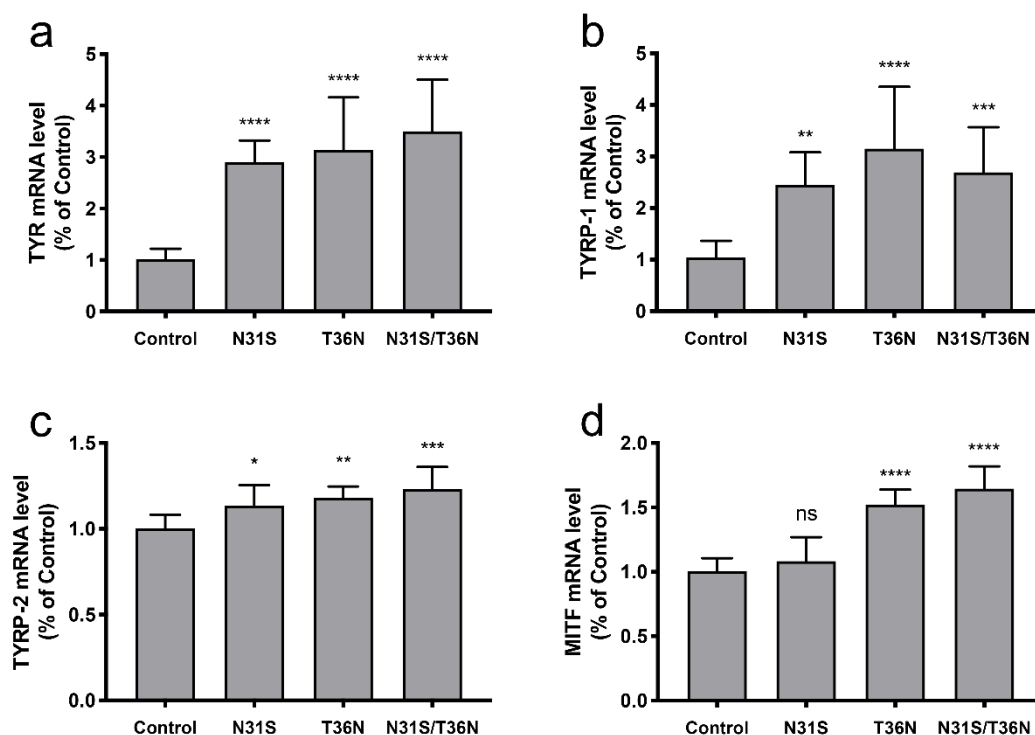


图 3-8 rFIP-glu 对 B16 细胞合成黑色素转录水平的影响

数据表示为 means $\pm$ SD ($n = 9$). 与空白对照组相比, ns, $p > 0.05$; *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$; ****, $p \leq 0.0001$.

另外, 由图 3-8 (d) 可以看出, rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N 处理 B16 细胞后的 *MITF* 基因表达量大幅提升, 促进了黑色素合成相关酶的同时可能对 B16 细胞的增殖抑制, 促进分化, 因此, 总黑色素表达量较对 *MITF* 基因表达量影响不大的 rFIP-glu N31S 无差异。



第四章 总结与展望

4.1 总结与讨论

本研究使用 rFIP-glu N31S、rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N 三种蛋白，初步探索了 rFIP-glu 对于 B16 细胞功能的影响，从研究 B16 细胞活性出发，深入到细胞信号通路的途径研究细胞增殖、凋亡，最后通过基因表达水平研究 B16 细胞黑色素的合成，如图 4-1 为本研究涉及的细胞内调控因子和基因及相互之间的关系。

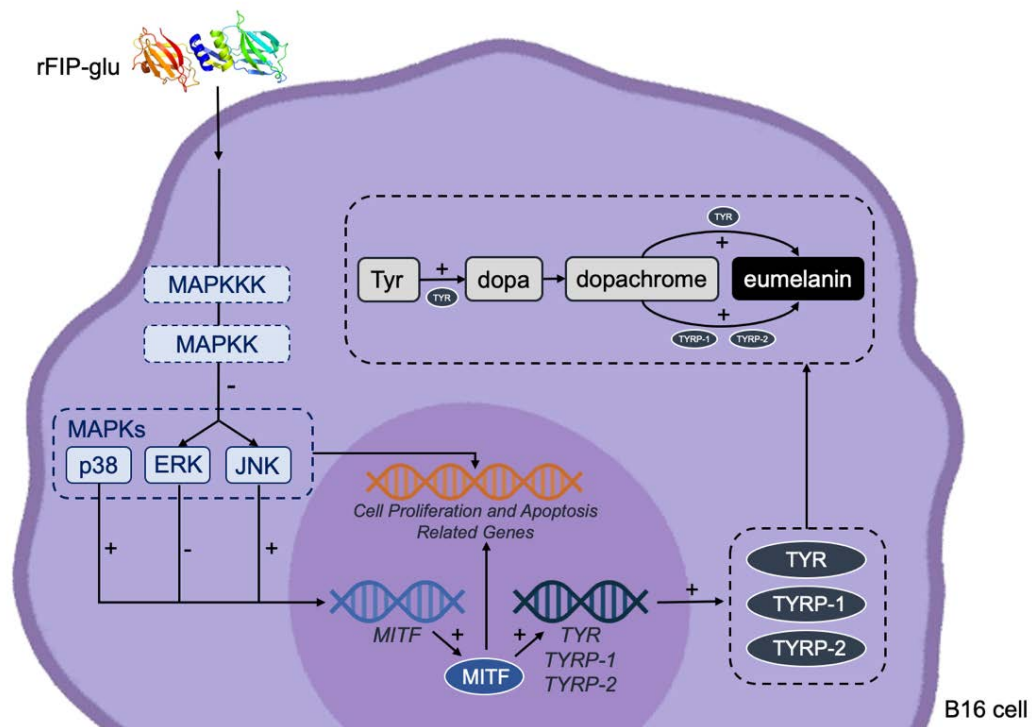


图 4-1 rFIP-glu 对 B16 细胞功能影响图

+: 正相关; -: 负相关.

4.1.1 rFIP-glu 对 B16 细胞生长活性的影响

黑色素瘤细胞作为一种恶性肿瘤细胞，研究其细胞活力及影响瘤细胞生长的相关信号通路有助于我们找治疗黑色素瘤的特效药。

本研究从肿瘤细胞研究最多的 MAPKs 信号通路入手，探究 rFIP-glu 对于三条典型 MAPKs 信号通路，p38 途径、ERK 途径和 JNK 途径的影响，发现在这三条途径中，三种 rFIP-glu 均对抑制 ERK 磷酸化最显著，表明能够降低通过 ERK 途径的 MAPK 级联反应，减少下一步对于瘤细胞增殖的诱导调控；此外，也能显著降低 JNK 途径磷酸化，而对于 p38 途径影响相较于对照差异不显著。总的来说，三种 rFIP-glu 对 B16 细胞 MAPKs 信号通路三种途径的影响由大到小为 ERK 途径 > JNK 途径 > p38 途径，能降低 B16 细胞的活力、抑制增殖和促进凋亡。通过研究也能验证这一猜测，如 3.2.1 的结果，三种 rFIP-glu 均能极显著抑制 B16 细胞的生长活力，并且使用 Annexin/PI 双染法检测可以知道，rFIP-glu 能促进



B16 细胞在晚期和早期的细胞凋亡, 在细胞晚期凋亡的数量更多。

除了 MAPKs 等信号通路能影响细胞的活性, 还有许许多多细胞因子能够影响细胞增殖和凋亡, 如 *MITF*。本研究还探究了 *MITF* 基因的表达水平, 除了 rFIP-glu N31S 外, 另外两个 rFIP-glu 均能极显著提高 *MITF* 基因的表达, 高水平 *MITF* 表达时, 细胞周期停滞, 抑制细胞增殖。

综上所述, rFIP-glu 能对 B16 细胞的细胞活力和增殖、凋亡调控有显著影响, 具体表现为降低 B16 细胞活力、抑制细胞增殖和促进凋亡。具有作为抗癌药剂原料的潜力, 和治疗其他肿瘤中作用相似, 在抗击黑色素瘤中同样行使了免疫调节功能, 抑制瘤细胞生长活性。

4.1.2 rFIP-glu 对 B16 细胞黑色素合成的影响

黑色素作为一类广泛存在于脊椎动物皮肤细胞中的蛋白质衍生物, 能影响肤色的同时, 也起到了保护皮肤免受紫外线伤害的作用。并且, 黑色素作为黑色素细胞特有产物, 研究黑色素含量变化, 也能反映黑色素细胞的功能特性变化。

本研究通过 rFIP-glu 处理 B16 细胞, 来探究其对 B16 细胞黑色素合成相关功能的影响。根据先前的文献已知 *MITF* 基因是会受到 MAPKs 信号通路的调控, 其中 ERK 途径与 *MITF* 水平呈负相关, 而 JNK 和 p38 途径与 *MITF* 水平呈正相关。本研究发现, 除了 rFIP-glu N31S 外, rFIP-glu 能够显著提高 *MITF* 基因的表达, 主要是由于 rFIP-glu 相较于空白对照具有极显著的抑制 ERK 途径的作用, 而对于 JNK 和 p38 途径的抑制作用不显著。*MITF* 水平提升, 能够促进 *TYR*、*TYRP-1* 和 *TYRP-2* 基因表达合成 *TYR*、*TYRP-1* 和 *TYRP-2* 蛋白, 这些蛋白都是促进合成真黑素过程中重要的酶, 相较于对照, 其中 rFIP-glu 在促进 *TYR* 基因表达的差异最为显著。对经过 rFIP-glu 处理后的 B16 细胞的黑色素含量和酪氨酸酶活性进行检测也能直接反映这一结果: 相较于对照, rFIP-glu 均能极显著地促进 B16 细胞合成黑色素, 显著地提升酪氨酸酶活性。

综上所述, rFIP-glu 能够通过提升 B16 细胞内酪氨酸酶活性而促进黑色素合成, 在基因水平表现为通过抑制 MAPKs 信号通路中的 ERK 途径, 促进 *MITF* 对于酪氨酸酶相关基因的表达调控, 最终达到调控黑色素含量的功能。

4.2 rFIP-glu 应用前景展望

随着生物技术的不断发展, 研究人员越来越熟练地运用基因工程手段生产生物活性物质, 相较于早期直接从灵芝菌丝体提取 FIP-glu, 每 300 克菌丝体仅能得到约 5-10 mg 纯 FIP-glu^[11], 使用毕赤酵母 GS115 表达 rFIP-glu, 文献报道最高能达到 800 mg/L^[77], 具有工业生产的条件。下一步, 如何将 FIPs 应用于人们的健康生活中, 作为原料添加在食品、护肤品甚至药品中是否合适, 是科研人员亟需解决的问题。

作为灵芝中被研究得最多的一类蛋白, FIPs 在抗过敏、抗肿瘤、促进淋巴细胞的增殖、诱导细胞分泌细胞因子和抗移植排斥等方面的作用已被证实。其中抗肿瘤、诱导细胞分泌因子等功能可以用于制备治疗肿瘤的药物, 例如淋巴瘤、黑色素瘤(恶性黑色素瘤)等^[26]。本研究也证实了 rFIP-glu 能作用于黑色素瘤细胞后, 能显著降低细胞活性, 促进细胞凋亡。

此外我们也推测 rFIP-glu 也具有作为化妆品原料的潜力, 已有研究认为 rFIP-glu 可以促进皮肤成纤维细胞生成胶原蛋白^[78], 达到抗衰老的功能, 并且同时也具有抗过敏、抑菌等功效, 是一种理想的化妆品原料, 先前已有许多品牌利用灵芝提取物作为护肤品原料并上市售卖^[8]。

本研究也发现, rFIP-glu 能够提升 B16 细胞合成黑色素的水平, 作为脊椎动物皮肤中不



可或缺的物质，黑色素起到了保护皮肤免受紫外线伤害的作用，也有文献报道，适当补充黑色素能达到抑制由于外界环境刺激而引发的衰老的目的^[79]。因此，rFIP-glu 也可以用于保护皮肤、延缓衰老的护肤品或营养品中。

4.3 创新点

本研究使用三种生物学活性更高的 rFIP-glu 突变体：rFIP-glu N31S、rFIP-glu T36N 和 rFIP-glu N31S/T36N，作用于小鼠黑色素瘤 B16 细胞，探究 rFIP-glu 对于 B16 细胞生物学功能的影响，通过 CCK-8 法和 AnnexinV/PI 双染法探究 rFIP-glu 对于 B16 细胞活力、细胞凋亡的影响，再通过 Western Blot 的方法，在表达水平上探究了 B16 细胞的 MAPKs 相关作用途径；使用碱裂解法研究了 rFIP-glu 对于 B16 细胞表达黑色素含量和酪氨酸酶活性的变化，同时通过 RT-qPCR 来验证来推测其对细胞功能在基因水平上的影响。



参考文献

- [1] 周选围, 林娟. 中国野生灵芝资源的开发利用[J]. 食用菌学报, 1999, 6(1): 58-64.
- [2] Yuen J W M, Gohel M D I. Anticancer effects of *Ganoderma lucidum*: a review of scientific evidence[J]. Nutrition and cancer, 2005, 1(53): 11-17.
- [3] Petrova E S, Rudina M I, Shvarts Y S. Antitumor potential of substances from the fungus *Ganoderma lucidum*[J]. Pharmaceutical Chemistry Journal, 2018, 52(1): 57-62.
- [4] Bojana B. *Ganoderma lucidum*: A potential for biotechnological production of anti-cancer and immunomodulatory drugs[J]. Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery, 2013, 8(3): 255-287.
- [5] 吴丹, 宋梦薇, 徐英杰, 等. 灵芝的研究现状[J]. 生物技术, 2004, 14(z1): 29-30.
- [6] 王林, 王玉红, 章克昌. 灵芝中药发酵液对慢性支气管炎疗效的研究[J]. 中国食用菌, 2004, 23(5): 39-41.
- [7] Zhao D, Dan-Ni X U, Wang D D, et al. Analysis of fermentation liquor of *Ganoderma lucidum* and evaluation of its whitening and anti- senility efficacy[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2016, 46(4): 226-230.
- [8] Li L D, Mao P W, Shao K D, et al. *Ganoderma* proteins and their potential applications in cosmetics[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(23): 9239-9250.
- [9] Sanodiya B S, Gulab Singh T, Baghel R K, et al. *Ganoderma lucidum*: a potent pharmacological macrofungus[J]. Current pharmaceutical biotechnology, 2009, 10(8): 717-742.
- [10] Zhou X W, Lin J, Yin Y Z, et al. Ganodermataceae : natural products and their related pharmacological functions[J]. American Journal of Chinese Medicine, 2007, 35(4): 559-574.
- [11] Kino K, Yamashita A, Yamaoka K, et al. Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8), from *Ganoderma lucidium*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1989, 264(1): 472.
- [12] Lin W H, Hung C H, Hsu C I, et al. Dimerization of the N-terminal amphipathic α -helix domain of the fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma tsugae* (Fip-gts) defined by a yeast two-hybrid system and site-directed mutagenesis[J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(32): 20044-8.
- [13] Vangelista L, Cesco-Gaspere M, Lamba D, et al. efficient folding of the Fc ϵ RI α -chain membrane-proximal domain D2 depends on the presence of the N-terminal domain D1[J]. Journal of Molecular Biology, 2002, 322(4): 815-825.
- [14] Mascarenhas N M, Gosavi S. Understanding protein domain-swapping using structure-based models of protein folding[J]. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 2017, 128: 113-120.
- [15] Paaventhana P, Joseph J S, Seow S V, et al. A 1.7Å structure of Fve, a member of the new fungal immunomodulatory protein family[J]. Journal of Molecular Biology, 2003, 332(2): 461-470.
- [16] Bienert S, Waterhouse A, De beer Tjaart a P, et al. The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 45(D1): D313-D319.
- [17] Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(W1): 296-303.



- [18] Tanaka S, Ko K, Kino K, et al. Complete amino acid sequence of an immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8). An immunomodulator from a fungus, *Ganoderma lucidum*, having similarity to immunoglobulin variable regions[J]. The Journal of biological chemistry, 1989, 264(28): 16372-16377.
- [19] Li Q Z, Zheng Y Z, Zhou X W. Fungal immunomodulatory proteins: characteristic, potential antitumor activities and their molecular mechanisms[J]. Drug Discovery Today, 2019, 24(1): 307-314.
- [20] 李奇璋. 重组灵芝免疫调节蛋白的高效表达及免疫调节活性的研究[D]. 中山大学, 2019.
- [21] Chan T, Lu X, Shams T, et al. The role of N-glycosylation in maintaining the transporter activity and expression of human oligopeptide transporter 1[J]. Molecular Pharmaceutics, 2016, 13(10): 3449-3456.
- [22] Chung H S, Kim J S, Lee S M, et al. Additional N-glycosylation in the N-terminal region of recombinant human alpha-1 antitrypsin enhances the circulatory half-life in Sprague-Dawley rats[J]. Glycoconjugate Journal, 2016, 33(2): 201-208.
- [23] Blanchard V, Liu X, Eigel S, et al. N-glycosylation and biological activity of recombinant human alpha1-antitrypsin expressed in a novel human neuronal cell line[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2011, 108(9): 2118-2128.
- [24] Bastiaan-Net S, Chanput W, Hertz A, et al. Biochemical and functional characterization of recombinant fungal immunomodulatory proteins (rFIPs)[J]. International Immunopharmacology, 2013, 15(1): 167-175.
- [25] Wu T Y, Chen H A, Li F Y, et al. High-level expression, purification and production of the fungal immunomodulatory protein-gts in baculovirus-infected insect larva[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 169(3): 976-989.
- [26] 周选围, 黎刘定吉, 毛培文, 等. 灵芝免疫调节蛋白突变体及应用[P]. 中国: CN110563822A, 2019-12-13.
- [27] Hsu H C, Hsu C I, Lin R H, et al. Fip-vvo, a new fungal immunomodulatory protein isolated from *Volvariella volvacea*[J]. Biochemical Journal, 1997, 323 (Pt 2): 557-65.
- [28] Li Q Z, Wang X F, Chen Y Y, et al. Cytokines expression induced by *Ganoderma sinensis* fungal immunomodulatory proteins (FIP-gsi) in mouse spleen cells[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 162(5): 1403-1413.
- [29] Lin Y L, Liang Y C, Tseng Y S, et al. An immunomodulatory protein, Ling Zhi-8, induced activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells by the NF- κ B and MAPK pathways[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2009, 86(4): 877-889.
- [30] Wang P H, Hsu C I, Tang S C, et al. Fungal immunomodulatory protein from *Flammulina velutipes* induces interferon- γ production through p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2004, 52(9): 2721-5.
- [31] Li Q Z, Chang Y Z, He Z M, et al. Immunomodulatory activity of *Ganoderma lucidum* immunomodulatory protein via PI3K/Akt and MAPK signaling pathways in RAW264.7 cells[J]. Journal of Cellular Physiology, 2019, 234(12): 23337-23348.
- [32] 林忠平, 白杰英, 李彦舫. 真菌免疫调节蛋白(FIP)结构与功能研究 [J]. 辽宁师范大学学报 (自然科学版), 2006, 29(1): 83-87.
- [33] Wu C T, Lin T Y, Hsu H Y, et al. Ling Zhi-8 mediates p53-dependent growth arrest of lung cancer cells proliferation via the ribosomal protein S7-MDM2-p53 pathway[J]. Carcinogenesis, 2011, 32(12): 1890-1896.



- [34] Ham Y M, Ko Y J, Song S M, et al. Anti-inflammatory effect of litsenolide B2 isolated from *Litsea japonica* fruit via suppressing NF- κ B and MAPK pathways in LPS-induced RAW264.7 cells[J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 13: 80-88.
- [35] N M. An immunomodulatory protein, ling ZHI-8, facilitates cellular interaction through modulation of adhesion molecules[J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 1992, 186(1): 385-390.
- [36] 唐建兵, 李勤, 程飏, 等. 黑色素细胞鉴定方法及非表皮来源黑色素细胞体外培养进展[J]. *中国美容整形外科杂志*, 2011, 22(4): 252-253.
- [37] 秦以龙. 内皮素 2(ET-2)促进体外培养绵羊皮肤黑色素细胞增殖和黑色素生成[D]. 山西农业大学, 2016.
- [38] 姬凯元, 范瑞文, 张俊珍, 等. 小鼠正常黑色素细胞与黑色素瘤细胞(B16)mRNA 表达差异分析[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2019, 35(1): 100-108.
- [39] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 黑色素瘤诊疗规范(2018 年版)[Z]. 北京: 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 2018.
- [40] 《中国黑色素瘤规范化病理诊断专家共识》编写组. 中国黑色素瘤规范化病理诊断专家共识(2017 年版)[J]. *中华病理学杂志*, 2018, 47(1): 7-13.
- [41] 李鑫, 薛春雨, 邢新. 恶性黑色素瘤细胞凋亡特点的研究进展[J]. *医学研究生学报*, 2005, 18(9): 849-852.
- [42] 刘凯. 重组灵芝免疫调节蛋白抗衰老与美白作用实验研究[D]. 吉林大学, 2016.
- [43] Lee H, Jun Cha H. *Poria cocos* Wolf extracts represses pigmentation *in vitro* and *in vivo*[J]. *Cellular and Molecular Biology*, 2018, 64(5): 80.
- [44] Son K H, Heo M Y. The evaluation of depigmenting efficacy in the skin for the development of new whitening agents in Korea[J]. *International journal of cosmetic science*, 2013, 35(1): 9-18.
- [45] 王倩, 张佳婵, 王昌涛, 等. 灵芝美容护肤作用机制及其在化妆品行业中的发展现状[J]. *日用化学工业*, 2019, 49(02): 61-68.
- [46] 王玉林, 何锦凤, 王维民, 等. 皮肤黑色素的产生及美白浅析[J]. *日用化学品科学*, 2013, 36(2): 33-35,49.
- [47] Roulin A, Mafli A, Wakamatsu K. Reptiles produce pheomelanin:evidence in the eastern hermann's tortoise (*Eurotestudo boettgeri*)[J]. *Journal of Herpetology*, 2013, 47(2): 258-261, 4.
- [48] 叶希韵, 朱萍亚. 黑色素的合成与美白产品的研究进展[J]. *华东师范大学学报(自然科学版)*, 2016, (2): 1-8.
- [49] Chien C C, Tsai M L, Chen C C, et al. Effects on tyrosinase activity by the extracts of *Ganoderma lucidum* and related mushrooms[J]. *Mycopathologia*, 2008, 166(2): 117-120.
- [50] 王哲鹏, 邓学梅, 王安如. 乌鸡黑色素对果蝇的紫外辐射保护作用[J]. *中国农业大学学报*, 2007, 12(1): 17-21.
- [51] 宁华. 工程菌所产黑色素对生物大分子光保护作用的研究[J]. *华中师范大学学报(自然科学版)*, 2001, 35(1): 85-88.
- [52] Gilchrest B A, Zhai S, Eller M S, et al. Treatment of human melanocytes and S91 melanoma cells with the DNA repair enzyme T4 endonuclease V enhances melanogenesis after ultraviolet irradiation[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 1993, 101(5): 666-672.
- [53] 杜国英. 孜然提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用及对 B16 黑色素瘤细胞内黑色素生成的影响[D]. 兰州理工大学, 2018.



- [54] Sánchez-Ferrer Á, Neptuno Rodríguez-López J, García-Cánovas F, et al. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1995, 1247(1): 1-11.
- [55] 马家芳, 孔燕, 郭军. MITF 在黑素瘤中的研究现状及进展[J]. *肿瘤*, 2013, 33(12): 1130-1134.
- [56] Kim A, Yang Y, Lee M-S, et al. NDRG2 gene expression in B16F10 melanoma cells restrains melanogenesis via inhibition of Mitf expression[J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2008, 21(6): 653-664.
- [57] Chae J K, Subedi L, Jeong M, et al. Gomisin N inhibits melanogenesis through regulating the PI3K/Akt and MAPK/ERK signaling pathways in melanocytes[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(2): 471.
- [58] Cheli Y, Giuliano S, Fenouille N, et al. Hypoxia and MITF control metastatic behaviour in mouse and human melanoma cells[J]. *Oncogene*, 2012, 31(19): 2461-2470.
- [59] Carreira S, Goodall J, Denat L, et al. Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness[J]. *Genes & Development*, 2006, 20(24): 3426-3439.
- [60] 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. 细胞生物学[M].第 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2011. 156-193.
- [61] 曾亮, 曹亚. MAPK 信号通路与肿瘤侵袭和转移研究进展[J]. *肿瘤防治研究*, 2002, 29(5): 419-421.
- [62] Seger R, Wexler S. The MAPK Signaling Cascades[M]. *Encyclopedia of Cell Biology* Waltham: Academic Press, 2016. 122-127.
- [63] 陈建勇. MAPK 信号通路研究进展[J]. *中国医药科学*, 2011, 8(1): 32-34.
- [64] Johnson G L, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases[J]. *Science*, 2002, 298(5600): 1911-1912.
- [65] 姜泽群. 几种中药有效成分促黑色素生成的机制研究[D]. 华中科技大学, 2009.
- [66] Sharma S M, Bronisz A, Hu R, et al. MITF and PU.1 recruit p38 MAPK and NFATc1 to target genes during osteoclast differentiation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(21): 15921-15929.
- [67] Singh S K, Sarkar C, Mallick S, et al. Human placental lipid induces melanogenesis through p38 MAPK in B16F10 mouse melanoma[J]. *Pigment Cell Research*, 2005, 18(2): 113-121.
- [68] Bu J, Ma P C, Chen Z Q, et al. Inhibition of MITF and tyrosinase by paeonol-stimulated JNK/SAPK to reduction of phosphorylated CREB[J]. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2008, 36(02): 245-263.
- [69] Rachmin I, Fisher D E. Microphthalmia-associated transcription factor phosphorylation: Cross talk between GSK3 and MAPK signaling[J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2019, 32(3): 345-347.
- [70] Lu L, Rao L, Jia H, et al. Baicalin positively regulates osteoclast function by activating MAPK/Mitf signalling[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2017, 21(7): 1361-1372.
- [71] 戴寿沅, 沈其, 陈静, 等. 毕赤酵母中表达 HSA/IL1ra 融合蛋白的产物不均一现象的研究[J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2008, 37(2): 32-36.
- [72] De Wachter C, Van Landuyt L, Callewaert N. Engineering of yeast glycoprotein expression[J]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2018: 1-43.
- [73] Zhou S, Guan S, Duan Z, et al. Molecular cloning, codon-optimized gene expression, and



- bioactivity assessment of two novel fungal immunomodulatory proteins from *Ganoderma applanatum* in *Pichia*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(13): 5483-5494.
- [74] 林菁, 彭华毅. 黄癸素诱导小鼠黑色素瘤 B16 细胞凋亡的研究[J]. 中国药理学通报, 2010, 12(26): 1630-1634.
- [75] 马文奎. 黑色素对皮肤的保护作用[J]. 中国化妆品, 1995, (02): 34.
- [76] Yeom G G M, Min S, Kim S Y. 2,3,5,6-Tetramethylpyrazine of *Ephedra sinica* regulates melanogenesis and inflammation in a UVA-induced melanoma/keratinocytes co-culture system[J]. International Immunopharmacology, 2014, 18(2): 262-269.
- [77] Liang C, Zhang S, Liu Z, et al. *Ganoderma lucidum* immunomodulatory protein(Lz-8) expressed in *Pichia pastoris* and the identification of immunocompetence[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2009, 25(03): 441-447.
- [78] 刘凯, 刘媛媛, 孙非, 等. 重组灵芝免疫调节蛋白对衰老模型小鼠的抗衰老作用[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(22): 5539-5540.
- [79] 赵艳平, 黄小红, 李建喜, 等. 乌骨鸡黑色素的研究进展[J]. 广东畜牧兽医科技, 2008, 33(1): 12-15.



谢辞

十分意外地，我在上海交通大学最后完成毕业设计论文撰写工作的大部分时间都是在家里完成的，由于 2020 年初席卷全球的新冠肺炎疫情，使得我们不得不推迟归校的日期，大幅缩减了我们在交大完成实验的时光。在这里，也表达对全国曾在一线奋斗过的医护人员、社区工作者和志愿者们的由衷感谢，没有他们的无私付出，我们也很难在如此快速的时间抑制住疫情，并满足能够归校继续完成毕业设计的条件。

回顾在上海交通大学的本科四年时光，可谓是充实而满足。从大二开始进入实验室，从开始懵懵懂懂的实验室小白，到能够为师弟师妹指导、设计实验，这期间经历了太多，若是要用三个词来形容我在实验学习生活中所经历的，可以描述为：成长、相伴和期许。

成长的道路上，奉献最大的就是一直在我前方指引我走在科研道路上的各位老师。首先我要感谢并致以崇高敬意的就是我的导师周选围教授，刚进实验室时给予我进行科研探索的信心，鼓励我多多学习实验室中的操作、巩固基础知识，并且细心指导我撰写、发表 Sci 论文，细致到文章语法和参考文献格式的修改，正是因为这些基础的训练，才有我在最终撰写毕业论文时候的从容不迫，在这里，我由衷地向您表示感谢！紧接着我也十分感谢那些在我本科四年学习生涯中帮助过我的老师，如实验课刘艳老师、班主任章竞瑾老师、潘琪芳老师、龚强老师、熊峰老师等等，由于他们的帮助，让我有更好更多的机会接触科研，认识科研的魅力，让我不断成长。

实验生活往往是枯燥的，但由于挚友的相伴，让我留下在实验室中美好的点点滴滴。首先要感谢那些与我相伴的师姐师兄们，毛培文师姐、邵科迪师兄、金梦圆师姐、杜晓英师姐、刘丰源师姐、李奇璋师兄和王蕾师姐，他们为我分担实验中的压力，一同解决实验中遇到的困难，分享各种实验生活小技巧，让我能更加适应在实验室的生活，在我大三大四的在学校时候，几乎每一天都会花费大部分时间在实验室，也正是他们，我才能取得如此丰厚成果。此外，我也要感谢我专业班上同学们，感谢王伟、陈嘉豪、蒋浩宇、孙子雯、洪剑伟等等，同学们相伴一同上实验课、外出专业实习、复习考试，使我的学习生活变得更加丰富多彩。

最后是期许。首先献给上面提到的老师们，期望老师们能培养出更多优秀的学子，并在自己的科研道路上一帆风顺，成果百出；其二是献给师姐师兄们，望你们能够收获更多科研成果，未来的工作、科研之路都能顺风顺水；其三是献给我的同学们，无论未来大家走向何方，都不要忘记彼此，“但行前路，无问西东”；最后献给还在实验室的师弟师妹们，张睿、杨怀昊、蒋逸凡等等，希望你们能够继续在科研道路不断前行，能争取走向自己理想的方向。

成长的道路上，会遇到许许多多的挫折和困难，但只要有人相伴，共同前进，终有一天会实现当初内心的期许。未来的生活还要继续，我们的故事还在书写，最后给未来的自己一个小小的期许，愿自己不忘初心，回顾成长道路的时候，不会忘记这些曾经感谢过的相伴自己在人生最美好年华共同奋斗的人们。

“天之涯，地之角，知交半零落。人生难得是欢聚，惟有别离多。”



PRELIMINARY EXPLORATION OF THE FUNCTION OF RECOMBINANT GANODERMA IMMUNOMODULATORY PROTEIN (RFIP-GLU) ON MOUSE MELANOMA CELL B16

As one of the hottest active ingredients in *Ganoderma lucidum*, FIP (Fungal immunomodulatory protein)-glu has been shown to have anti-tumor and anti-aging biological functions. The recombinant FIP-glu (rFIP-glu), which is genetically engineered, can exert immunomodulatory effects through MAPK (mitogen-activated protein kinase) and PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) signaling pathways, and is of high medicinal value. As early as 1989, FIP-glu was isolated and the N-terminal acetylated end of this protein consisting of 110 amino acids was identified, and some of the natural FIPs that were later isolated had glycosylation modifications. It is shown that FIPs have the potential for post-expression modification to improve protein activity through acetylation, phosphorylation and glycosylation. The rFIP-glu was subsequently produced by genetic engineering using the *Pichia pastoris* GS115 expression system, and after bioinformatics analysis, the rFIP-glu was found to have multiple N-glycosylation sites (Asn-X-Ser/Thr). Previous studies have shown that site-specific mutagenesis of N-glycosylation sites on proteins resulted in improved protein yield, stability, and biological activity.

Melanocytes (MC), as a class of cells widely found in the skin of vertebrates, have the function of secreting melanin, which protects the skin from environmental factors, and become malignant melanoma cells when they become cancerous. The ability of melanoma cells to induce apoptosis is drastically reduced compared to normal cells, and they fail to respond to a wide range of daily stimuli, so conventional treatments are less effective in inhibiting melanoma cell metastasis and proliferation. A study comparing the differences in mRNA levels between normal mouse melanocytes and mouse melanoma B16 cells found that multiple cancer-related signaling pathways were altered in B16 cells, such as the common MAPK pathway, TGF- β (transforming growth factor- β) pathway, NF- κ B (nuclear factor kappa-B) pathway, etc. Multiple regulatory pathways were activated. In addition, expression of enzyme genes associated with melanin synthesis, such as tyrosinase (TYR), tyrosinase-related protein-1 (TYRP-1), tyrosinase-related protein-2 (TYRP-2), and melanogenesis-related transcription factors were up-regulated, and melanin expression increased.

The skin tone of vertebrates is the result of the synergistic action of multiple pigments, the decisive one being the melanin content. External environmental factors such as UV exposure in the sun can cause disorders in the metabolism of melanogenesis-related enzymes in the skin, leading to darkening of the complexion and even skin-related cancers. In existing studies, rFIP-glu is known to inhibit B16 cell proliferation, but there have been no in-depth studies to explore how rFIP-glu affects the biological activity of B16 cells through cell signaling pathways. In recent years, the incidence of melanoma in China has been increasing and the death rate is high. Therefore, there is



a need to explore the mechanism by which melanoma cells produce melanin, and how drugs affect this mechanism, in order to further address the inconvenience caused by melanoma.

FIP-glu, as a protein in *Ganoderma lucidum* with a variety of biological activities such as immunomodulation, antitumor and anti-aging, has value as an antitumor drug raw material and cosmetic raw material. In a previous study, using genetic engineering to construct yeast-engineered bacteria, rFIP-glu with mass production conditions can exert immunomodulatory functions within macrophages RAW264.7 via MAPK and PI3K signaling pathways, and can act on part of MAPKs. rFIP-glu-based glycosylated mutants rFIP-glu N31S, rFIP-glu T36N and rFIP-glu N31S/T36N have better biological activity and lower toxicity to macrophages. In previous studies of FIP-glu, little has been done on melanoma cells, although it has been shown to reduce the proliferative viability of melanoma cells, but no more in-depth studies have been conducted.

In this study, we used genetic engineering to construct the yeast GS115 engineering bacteria, which can produce rFIP-glu. Three glycosylated mutants based on rFIP-glu, rFIP-glu N31S, rFIP-glu T36N and rFIP-glu N31S/T36N, were found to have better biological activity and lower toxicity to macrophages compared to wild-type FIP-glu in previous studies. Therefore, in this study, three rFIP-glu, rFIP-glu N31S, rFIP-glu T36N and rFIP-glu N31S/T36N, were used to act on mouse melanoma B16 cells. By constructing three rFIP-glu of the *Pichia pastoris* yeast GS115 engineering bacteria, the transformed yeast transformants were incubated with methanol-type induction medium, the proteins were purified with HisSep Ni-NTA agarose purification resin, and the purified proteins were then identified using SDS-PAGE and Western Blot for treatment of B16 cells after being identified as our desired destination protein.

The cell viability of rFIP-glu treated B16 cells was measured using the CCK-8 method, and all experimental treatment groups were extremely significantly lower than the blank control ($p \leq 0.0001$) by about 60 %, which can be presumed to have the ability to reduce tumor cell proliferation and promote apoptosis. The apoptosis was again detected using AnnexinV/PI double staining and rFIP-glu was found to promote early apoptosis and also promote necrosis and late apoptosis of B16 cells, which inhibited the viability of B16 cells. Further using Western Blot to compare the kinase protein expression of different pathways of MAPKs pathway, the three rFIP-glu showed instability and large error for the p38 (p38 MAPK) pathway, and the results were significantly different from each other, and it was speculated that rFIP-glu had limited effect on the p38 pathway; the three rFIP-glu had some inhibitory effect on the JNK (c-Jun N-terminal kinase) pathway, and the p-JNK content was decreased, but the difference was not extremely significant; for the ERK (extracellular signal-regulated kinase) pathway, rFIP-glu all had extremely significant inhibitory effect on phosphorylation, and it was speculated that rFIP-glu mainly carried out immunomodulatory activities on B16 cells through the ERK pathway of MAPK signaling.

On the other hand, exploring rFIP-glu on melanin-related indicators of B16 cell synthesis is based on previous literature that *MITF* (melanogenesis associated transcription factor) genes are known to be regulated by MAPKs signaling pathways, where the ERK pathway is negatively correlated with MITF levels, while the JNK and p38 pathways are positively correlated with MITF levels. In this study, except for rFIP-glu N31S, rFIP-glu was able to significantly increase the expression of *MITF* gene, mainly because rFIP-glu inhibited the ERK pathway significantly compared with the blank control, but not the JNK and p38 pathways, and the elevated MITF level promoted the expression of TYR, TYRP-1 and TYRP-2 proteins, which are important enzymes in promoting the synthesis of eumelanin. This result was also directly reflected in the detection of



melanin content and tyrosinase activity in rFIP-glu treated B16 cells: both rFIP-glu significantly promoted melanin synthesis and significantly enhanced tyrosinase activity in B16 cells compared to the control. At the same time, increased *MITF* gene expression also has the function of inhibiting tumor cell proliferation.

In summary, rFIP-glu has the effect of inhibiting melanoma cell viability and promoting apoptosis, as well as increasing melanin synthesis, and can be used as a raw material for nutrients, skin care products or pharmaceuticals that protect the skin and inhibit melanoma cell function. With the continuous development of biotechnology, researchers are becoming more and more skilled in using genetic engineering to produce bioactive substances. Compared with the earlier direct extraction of FIP-glu from *Ganoderma lucidum* mycelium, only about 5-10 mg of pure FIP-glu can be obtained per 300 g of mycelium. Next, the question of how to apply FIPs to people's healthy lives and whether it is appropriate to add them as ingredients in food, skin care products and even pharmaceuticals is an urgent one for researchers to address.

As the most studied class of proteins in *Ganoderma lucidum*, the role of FIPs has been demonstrated in anti-allergy, anti-tumor, promotion of lymphocyte proliferation, induction of cytokine secretion and resistance to transplant rejection. Among them, anti-tumor, induced cytokines and other functions can be used to prepare drugs for the treatment of tumors, such as lymphoma, melanoma (malignant melanoma), etc. This study also confirmed that rFIP-glu can significantly reduce cell activity and promote apoptosis after acting on melanoma cells.

In addition, we also speculate that rFIP-glu also has the potential to be used as a cosmetic raw material. rFIP-glu has been found to promote the production of collagen in skin fibroblasts to achieve anti-aging function, and also has anti-allergy and antibacterial effects, is an ideal cosmetic raw material.

In the present study, it was found that rFIP-glu enhances the synthesis of melanin in B16 cells, which is an essential substance in vertebrate skin and protects the skin from UV damage. Therefore, rFIP-glu can also be used in skin care products that protect the skin and delay aging or in nutritional products.



本科期间参加的科研项目与发表的论文

1. 已发表论文

- [1] **Li Liu-Dingji**, Mao Pei-Wen, Shao Ke-Di, Bai Xiao-Hui, Zhou Xuan-Wei. *Ganoderma* proteins and their potential applications in cosmetics[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(23): 9239-9250. (IF:3.822)
- [2] Mao Pei-Wen, **Li Liu-Dingji**, Wang Yu-liang, Bai Xiao-Hui, Zhou Xuan-Wei. Optimization of the fermentation parameters for the production of *Ganoderma lucidum* immunomodulatory protein by *Pichia pastoris*[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2020, 50(4): 357-364. (IF:1.228)
- [3] Shao Ke-Di, Mao Pei-Wen, Li Qi-Zhang, **Li Liu-Ding-Ji**, Wang Yu-liang, Zhou Xuan-Wei. Characterization of a novel fungal immunomodulatory protein, FIP-SJ75 shuffled from *Ganoderma lucidum*, *Flammulina velutipes* and *Volvariella volvacea*[J]. Food and Agricultural Immunology, 2019, 30(1): 1253-1270. (IF: 2.398)
- [4] Liu Yan, Mao Peiwen, Jin Mengyuan, **Li Liudingji**, Bai Xiaohui, Zhou Xuanwei. Breaking the sporoderm of *Ganoderma lucidum* spores by combining enzymatic hydrolysis reaction with physical actuation[J]. Biocell, 2019, 43(7-1): 458-465. (IF: 0.636)
- [5] 周选围, 高秀莲, 毛培文, **黎刘定吉**. 不同粒色青稞及其生物处理样品中脂肪含量和脂肪酸组成分析[J]. 上海交通大学学报 (农业科学版), 2019, 6.

2. 已公开专利

- [1] 周选围, **黎刘定吉**, 毛培文, 李奇璋. 灵芝免疫调节蛋白突变体及应用[P]. 中国: CN110563822A, 2019-12-13.

3. 参与的科研项目及成果

- [1] 第三届“绿谷杯”本科生课外创新评比项目获评潜力组一等奖;
- [2] 第四届“绿谷杯”本科生课外创新评比项目获评潜力组一等奖;
- [3] 第31期PRP项目 (2016.10-2017.10): Structure and construction of photography picture sale website, 项目评价优秀, 获得A+等级;
- [4] 第34期PRP项目 (2018.04-2019.04): 不同来源真菌免疫调节蛋白之结构特征的比较研究, 项目评价优秀, 获得A-等级。