

猪苓菌丝形成菌核差异蛋白质组学研究

李兵 王春兰 邢咏梅 曾旭 田丽霞 郭顺星*

中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所 北京 100193

摘要：药用真菌猪苓菌丝形成菌核分子机制一直是人们关注的热点问题。本研究首次对猪苓进行了系统的蛋白质组学研究。基于液质联用技术并在数据依赖性采集模式下，成功鉴定了猪苓菌丝形成菌核的初始期、菌核生长期和成熟期的蛋白质组，共鉴定蛋白 1 391 个 (global FDR 1%)。采用先进的 SWATH MS^{ALL} 的非标记定量方式对初始期菌丝和菌核进行了差异蛋白质组学研究，从中定量蛋白 1 234 个，占鉴定蛋白数量的 88.7%。猪苓菌丝形成菌核过程中有 378 个蛋白差异表达。差异蛋白 GO 注释结果表明，在猪苓菌丝形成菌核过程中，差异蛋白参与的蛋白功能和生物学过程多样，以催化和结合为主，还参与感知环境刺激、信号转导、电子转移、过氧化活性、菌丝生长及胞壁合成等功能。进一步推测分析表明，猪苓菌丝形成菌核可能是由于缺氧或温差等多种环境胁迫诱导所致，生成活性氧并形成氧化应激状态。信号通过丝裂原活化蛋白激酶通路 (MAPK 通路) 途径向下游传递，可能调控了胞壁蛋白糖基化修饰，进而促进猪苓菌丝极性生长和菌丝形态学变化而形成菌核。KEGG 代谢通路分析表明，差异蛋白还主要参与了糖、脂质和氨基酸等初级产物以及甾醇、多聚乙酰等次级代谢物的合成与代谢。因此，对差异蛋白质组的深入解析和研究有利于揭示猪苓菌丝形成菌核的蛋白分子机制，具有较强的理论和现实意义。

关键词：猪苓，蛋白质组学，SWATH 非标记定量，环境胁迫，丝裂原活化蛋白激酶通路，细胞极性，胞壁蛋白糖基化修饰

Differential proteome analysis of sclerotium formation stages of *Polyporus umbellatus*

LI Bing WANG Chun-Lan XING Yong-Mei ZENG Xu TIAN Li-Xia GUO Shun-Xing*

Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: The mechanisms of sclerotial formation from the hyphae of the medicinal fungus *Polyporus umbellatus* was

基金项目：国家自然科学基金重点项目 (30830117)；药用植物研究所“创新团队发展计划”(PIRTI-IT1302)；山西省煤基重点科技攻关项目“设施食用菌高效碳循环研究与示范”(FT2014-03)；河北山区特色中药材种质资源评价与仿野生栽培技术与示范 (16232503D-X-2)

Supported by National Natural Science Foundation of China (30830117), the Program for Innovative Research Team in IMPLAD (PIRTI-IT1302), Coal Base Key Scientific and Technology Project of Shanxi Province “Research and demonstration of high efficient carbon cycle in edible fungi” (FT2014-03) and Evaluation of Germplasm Resources of Chinese Medicinal Hebei Mountain Area and Demonstration of Imitation Wild Cultivation Technology (16232503D-X-2).

*Corresponding author. E-mail: sxguo1986@163.com

Received: 2016-08-01, accepted: 2016-11-02

investigated. Proteomics based on LC-MS was introduced into *P. umbellatus*. A total of 1 391 proteins were identified from sclerotia and hyphae at initial, developmental and mature phases based on data dependent acquisition (DDA) model. In total, 1 234 proteins were quantified from initial sclerotia and hyphae based on SWATH (Sequential Window Acquisition of all theoretical fragment ions) label-free model, and there were 378 proteins expressed differentially including 322 known and 56 unknown proteins. GO analytic results showed that these differential proteins were of varieties in molecular function and biological process during the sclerotial formation from the hyphae. Most of differential proteins were involved in catalytic and binding activities, and some were associated with response to stimulus, signal transduction, electron carrier, peroxidase activity, filamentous growth, cell wall biogenesis and so on. Further analysis results showed that types of stress (such as difference in temperature, hypoxia, etc.) induced the sclerotial formation of *P. umbellatus* from hypha, resulted in reactive oxygen species (ROS) generation and then developed into oxidative stress (OS). The signal transduced via MAPK pathway, and might regulate glycosylation of cell wall proteins, which were associated with cell polarities and filamentous hypha morphological changes. Besides, KEGG analysis indicated that proteins involved in synthesis and metabolism of secondary metabolites (such as terpenoids and polyketides) expressed differentially. It was the first time study on the proteome of *P. umbellatus*, which may be useful to deepen the knowledge on sclerotial formation.

Key words: *Polyporus umbellatus*, proteomics, SWATH label-free quantification, environmental stress, MAPK pathway, cell polarity, glycosylation of cell wall proteins

猪苓 *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fr.为我国传统药用真菌,具有利水渗湿等功效(中华人民共和国药典委员会 2015)。现代药理学实验证实,猪苓多糖可用于肿瘤的辅助治疗(Bandara *et al.* 2015)。猪苓的药用部位是猪苓菌核,其独特的生长发育特性、野生资源过度采挖以及基础研究相对滞后等因素致使猪苓资源不足和种质资源退化。国内科研工作者对猪苓进行了较为系统的研究,猪苓的实验室培育技术和仿野生栽培业已成熟,并摸索出了猪苓菌丝形成菌核或促进成核的物理、化学和生物因素等(Guo *et al.* 2002; 邢咏梅和郭顺星 2011; Xing *et al.* 2015)。与蜜环菌侵染猪苓菌核的过程伴随着活性氧物质(relative oxygen species, ROS)的生成一样,低温环境可诱导菌丝形成菌核,且能够提高胞内氧化电势(夏洪燕和郭顺星 2002; Xing *et al.* 2013b)。这与 Ca^{2+} 和蛋白磷酸化有着密切的关系。Xing *et al.* (2013a)在猪苓果糖完全培养基中添加二苯基氯化碘盐(diphenyleneiodonium chloride, DPI)后,菌丝形成菌核数量减少、成核过程减慢甚至不成核。证明 ROS 诱导的氧化应激是猪苓菌丝形成菌

核的关键。尽管如此,猪苓菌丝形成菌核的分子机制仍然模糊不清,许多未解之谜期待研究者去探索。

蛋白质组学作为后基因时代的方法学,因其研究对象为蛋白质而备受青睐。质谱技术的发展及其在生物领域的应用使得蛋白质组学成为一种高效、相对低成本、高通量的实用工具。近年来,蛋白质组学已成功应用于一些丝状真菌的研究中,并探索研究了环境对真菌、真菌对人或动物的影响、以及真菌自身生物代谢历程等领域(Bhadauria *et al.* 2007; Kim *et al.* 2007)。

为探索猪苓菌丝形成菌核的蛋白分子机制及其生长发育历程,我们首次对猪苓的蛋白质组进行了系统的研究,为后期深入研究猪苓提供坚实的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

猪苓菌种由中国医学科学院药用植物研究所菌根研究室提供。

1.2 猪苓菌核培养

本研究中,猪苓菌丝形成菌核采用平皿培养的

方式。猪苓菌丝接种于果糖培养基中,室温黑暗培养。接种后的第 30 天、40 天和 90 天收集同一皿中的菌丝和菌核,分别作为初始期 (initial phase, I)、生长期 (developmental phase, D) 和成熟期 (mature phase, M) 的菌丝 (hypha, H) 及菌核 (sclerotia, S) (Xing *et al.* 2013b)。称重,锡箔纸包裹,液氮保存,待用。

1.3 多肽样品制备

1.3.1 总蛋白提取及定量:取实验材料,液氮研磨至细粉,按 300mL/100mg 的比例加入丝状真菌蛋白提取试剂TM (贝博生物, A:B=500:1, A 液为蛋白提取混合溶液, B 液为蛋白酶抑制剂),再次充分研磨;转移溶液至低蛋白吸附管TM (Eppendorf) 中,在 4℃ 培养箱中 150r/min 震摇 20min;提取的混合溶液 4℃ 14 000r/min 离心 15min,取上清得蛋白溶液。用 BCA 法进行蛋白定量。

1.3.2 TCA-丙酮法沉淀纯化蛋白:准确移取 IH 及 IS、DH 及 DS 和 MH 及 MS 的蛋白提取液各适量 (蛋白含量 110μg),加入等体积的 20%三氯乙酸溶液,涡旋,-80℃ 沉淀 3h;4℃ 20 000×g 离心 30min,去上清;加入 200μL 冷丙酮至沉淀物中,冰浴超声混悬均匀,-80℃ 静置过夜。

1.3.3 还原乙酰化:丙酮混悬液 4℃ 20 000×g 离心 30min,弃丙酮,室温挥发丙酮 (不可完全挥发,以免复溶困难);每一样品中加入 70μL 0.2% RapiGest SFTM (Waters) 的 50mmol/L 碳酸氢铵溶液 (ammonium bicarbonate, ABC) (Huang *et al.* 2009),管口敞开,37℃ 恒温震荡 (300r/min) 10min,使丙酮完全挥发;超声溶解。加入 8μL 50mmol/L 三 (2-羧乙基) 膦 [Tris(2-carboxyethyl)phosphine, TCEP, BOC Sciences] 的 50mmol/L ABC 和 2μL 的

50mmol/L ABC,涡旋,60℃ 孵育 30min。放置冷却至室温,加入 9μL 100mmol/L 碘代乙酰胺 (iodoacetamide, IAA, Sigma) 的 50mmol/L ABC 和 1μL ABC,涡旋,黑暗室温反应 30min。

1.3.4 限制性酶切反应:在乙酰化蛋白溶液中加入 2.5μg 测序级修饰胰蛋白酶 (酶:蛋白=1:40),涡旋,37℃ 孵育过夜。然后加入 5μL 10% 三氟乙酸TM (trifluoroacetic acid, TFA, Sigma) 溶液,37℃ 反应 1h,终止酶切反应。4℃ 20 000×g 离心 10min。肽段溶液过 10kDa 滤膜 (回收率约为 92%),去除大于 10kDa 的肽段,收集滤液,得浓度约为 1μg/μL 的肽段样品溶液。

1.4 组学数据采集

1.4.1 猪苓 shotgun 蛋白库:分别取上述样品的多肽溶液各 10μL,混匀。用 AB Sciex5600+ TripleTOF 平台 [Eksigent400nano-HPLC 系统 (Eksigent, AB Sciex, U.S.) 和 5600+ TripleTOF 质谱仪 (AB Sciex)],在 DDA 模式下对混合样品进行数据采集。首先,精密量取混合肽段溶液 5μL,注入 Nano LC 富集柱 (Eksigent, AB Sciex, 350μm×0.5mm, Chrom XP C18-3μm, 120A),以流动相甲酸:乙腈:水 (0.1:2:98, V/V/V) 对肽段进行等度洗脱 10min,流速为 2μL/min,以达到对混合肽段进行富集和除盐的目的。然后,肽段用毛细管色谱柱 (北京乐普科技, 75μm×20cm, Sunchrom C18-5μm, 120A) 进行梯度分离,洗脱流速为 300nL/min,梯度见表 1。其中, A 相:甲酸:乙腈:水 (0.1:2:98, V/V/V); B 相:甲酸:乙腈:水 (0.1:98:2, V/V/V)。高分辨模型下,在 350–650m/z 和 645–1 250m/z 范围扫描采集一级谱图。TOF MS 参数设置如下: nano 电喷雾, GS1 为 10, CUR 为 30, ISDF 为 2 300, IHF 为 100,

表 1 流动相梯度变化表

Table 1 Gradient elution table

| Time (min) | 0 | 60 | 95 | 105 | 105.5 | 111.5 | 112 | 120 |
|------------|----|----|----|-----|-------|-------|-----|-----|
| Phase A | 95 | 83 | 73 | 50 | 20 | 20 | 95 | 95 |
| Phase B | 5 | 17 | 27 | 50 | 80 | 80 | 5 | 5 |

DP 为 100, CE 为 10, 累计时间 250ms, 质量数偏差 50mDa。动态排除采集时间设为 15s, 电荷设置范围为 2–5。高灵敏度模式下采集碎片离子 2 级谱图 (MS2), 质荷比 (m/z) 范围 100–1 500, 一次循环采集时间 100ms。

1.4.2 样品 SWATH 采集: 建立 SWATH 采集方法。在 DDA 模式下, 350–1 250 m/z 范围内对混合多肽进行一次数据采集, PeakView 2.0 (AB Sciex) 处理获得子离子 m/z 和信号强度后, 可变窗口计算器 (V 0.2 112513) (AB Sciex) 计算 SWATH-MS 动态采集窗口大小。其参数设置为: 窗口数量 60 个, 最小 m/z 400, 最大 m/z 1 250, 窗口重叠 0.5Da, CES 为 15。计算得数据采集系列窗口。高灵敏度模式下采集 MS2 谱图, 100–1 500 m/z , 一次循环时间 1.42s, CES15V, 电荷 2, CE10V。最后, 以 nano-LC 和 SWATH MS^{ALL} 方法对初始期的菌丝体 (对照组, IH) 和菌核 (实验组, IS) 肽段样品进行 SWATH 数据采集, 每组设置 3 个生物学重复, 每一样本重复采集 SWATH 数据 3 次。

1.5 数据处理及生物信息学分析

将猪苓转录组库 (Liu *et al.* 2015) 中 unigene 翻译生成蛋白质组库 (.fasta)。以 Uniprot 库为基础, 对 unigene 翻译注释, 能进行翻译注释的以 uniprot 的 ID 标识, 未知蛋白仍以 “comp” 表示, 最后获得含 22 936 个蛋白的蛋白组库 (.fasta)。ProteinPilot 软件对 DDA 模式采集数据进行蛋白鉴定, 其参数设置如下: 样品类型: 鉴定; 半胱氨酸乙酰化修饰: 碘代乙酰胺; 酶切: 限制性胰酶; 仪器型号: TripleTOF5600; 特殊参数: 无; 物种: 无; 搜索类型: ID; 蛋白鉴定结果质量控制阈值 [unused protscope (conf)]: 0.05 (10%); 同时进行错误发现率 (false discovery rate, FDR) 分析。其搜索结果形成鉴定蛋白库。

用 Peak View SWATH Processing Micro App (AB Sciex, v.1.0.0.1409) 对 IH 和 IS 采集的 SWATH 数据进行处理, 对保留时间进行校正后, 从鉴定蛋白库中提取可被 SWATH 定量的蛋白及其对应的肽段和

碎片离子信息。SWATH 数据处理参数设置为: 每一蛋白至少 6 条可定量多肽, 每一多肽至少 6 组可定量的碎片离子, 提取窗口时间 15min, 质荷比偏差 50mg/mL, 置信范围 95%, FDR 1.0%。

Markerview (AB SCIEX, 1.2.1.1) 对 IS 与 IH 进行相对定量比较。面积归一化后, 根据参数 $P \leq 0.05$ 和 $IS/IH \geq 1.5$ 或 ≤ 0.067 , 最终获得菌丝形成菌核过程中的差异表达蛋白。差异蛋白再进行 GO 注释 (Ashburner *et al.* 2000) 和 KEGG 通路分析 (Kanehisa *et al.* 2016)。

2 结果与分析

2.1 猪苓蛋白质组鉴定

猪苓初始期、生长期和成熟期的菌核与菌丝体酶切肽段混合物经纳升二维色谱除盐、富集和分离后, AB SCIEX 5600+Triple TOF MS 电离并采集数据, 经 ProteinPilot 鉴定, 置信水平在 1%范围内的蛋白共 1 391 个, 其 global FDR 为 63.7%; 置信水平在 1%范围内的肽段共 8 204 个, 其 global FDR 为 89.2%; 置信水平在 1%范围内的二级谱图共 29 241 个, 其 global FDR 为 73.9%。其中已知蛋白 1 226 个, 未知蛋白 165 个。

2.2 猪苓菌丝形成菌核差异蛋白

2.2.1 非标记定量: 本研究采用非标记定量方式对蛋白样本进行定量。共采集初始期猪苓菌丝和菌核等两组样品, 每组 3 个生物样本重复, 每一样本重复采集 3 次, 共计 18 个 SWATH 数据。DDA 数据库与 SWATH 数据间保留时间线性关系良好, 经校正后得新的 DDA 谱图数据库。经提取, 本实验中有 1 234 个蛋白能够被准确定量, 占到总鉴定蛋白数量的 88.7%, 未知蛋白 138 个, 已知蛋白 1 096 个。

2.2.2 猪苓菌丝形成菌核差异蛋白: 为获得猪苓菌丝形成菌核过程中蛋白质差异表达情况, 将 IS 组与 IH 组进行显著性表达分析。MarkerView 软件对峰面积进行归一化处理后, 模拟蛋白峰面积 P 值与比值 (fold change) 之间关系, 结果显示 P 与 Log (fold change) 间呈火山图分布 (图 1A)。再进行

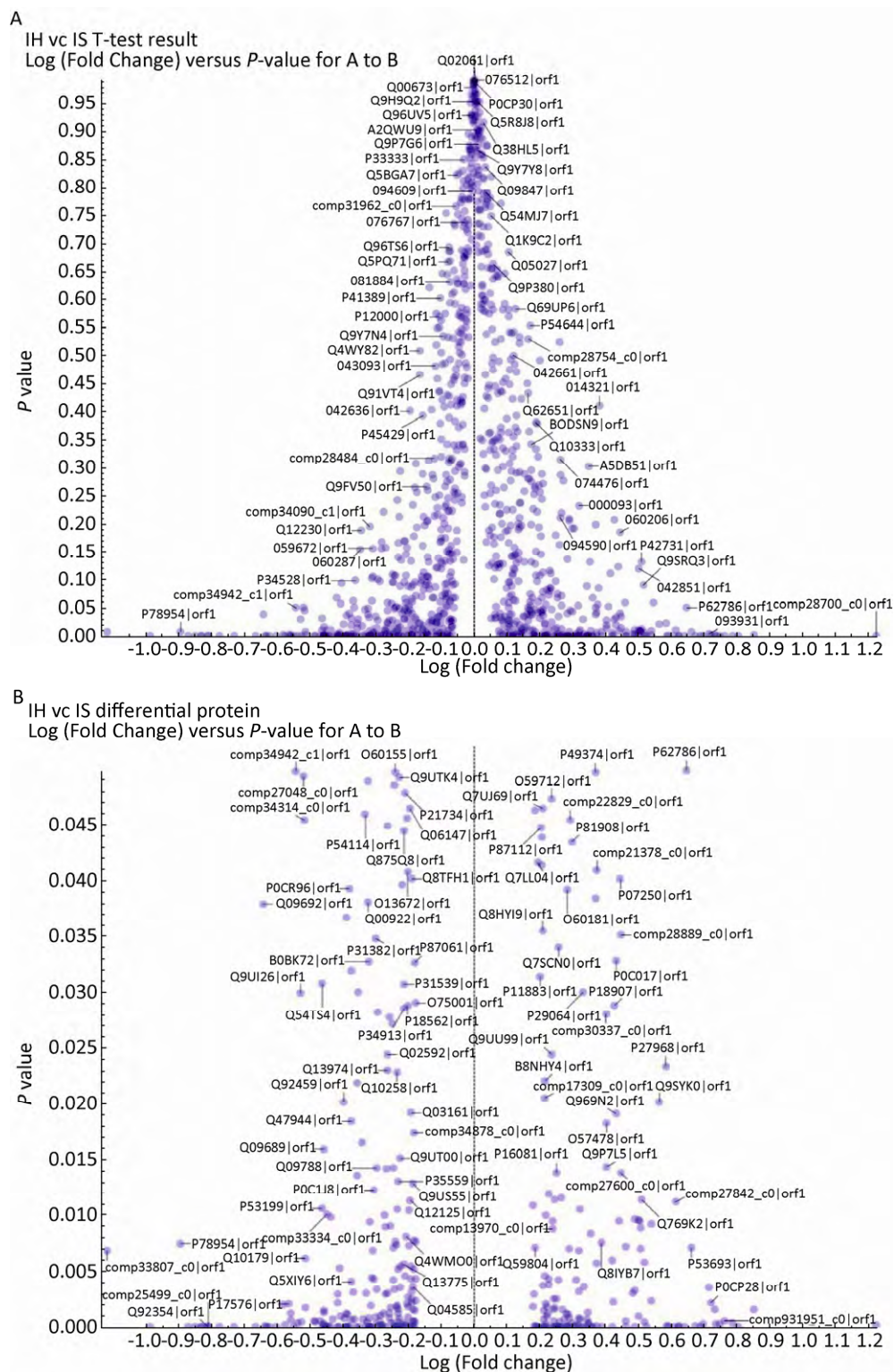


图 1 猪苓菌丝与菌核蛋白质组火山图 (*P*-value 与 Fold change) (A) 及差异蛋白统计分布结果 (B)

Fig. 1 Volcano plot of total quantified proteins of initial sclerotia (IS) and initial hypha (IH) (A), and volcano plot of differential proteins between IS and IH (B).

T-test 检验, 设置 *P* 值为 0.05 且蛋白峰面积比值为 1.5 或 0.67。剔除 $P \geq 0.05$ 和 $0.67 < \text{比值} < 1.5$ 的蛋白, 最终得到 378 个差异蛋白, 包括 322 个已知蛋白和 56 个未知蛋白 (图 1B)。

2.2.3 GO 注释: IS 与 IH 组比较而得的 322 个已知功能的差异蛋白进行 GO 注释 (图 2)。GO 结果表明猪苓菌丝形成菌核中的差异蛋白功能呈多样性分布, 主要分布在细胞和一些细胞器, 也有相当数量的蛋白是位于线粒体、线粒体膜、电子转运链等位点的一些蛋白或复合体 (图 2), 菌核内 ROS 可能产生于这些部位或与这些部位相关, 而 CeCl_3 亚细胞定位证实了 H_2O_2 主要分布在膜周围 (Xing *et al.* 2013a)。

猪苓菌丝形成菌核过程中的差异蛋白主要参与代谢过程、细胞内过程和单 (多) 器官历程 (图 2)。与菌丝相比, SWATH 非标记定量结果显示, 猪苓菌核电子转移链复合体 (complex) 亚基琥珀酸脱氢酶黄素蛋白 A 和 B (succinate dehydrogenase[ubiquinone] flavoprotein subunit (FP), SDHA/B, Q9UTJ7, P32420) 和三羧酸循环

中异柠檬酸脱氢酶 1 和 2 (isocitrate dehydrogenase subunit1, IDH1, Q13302 和 isocitrate dehydrogenase subunit2, IDH2, Q9USP8) 下调表达, 表明猪苓菌核形成过程中电子呼吸链和 TCA 循环受到了抑制, 有氧呼吸受阻 (King *et al.* 2006; Guzy *et al.* 2008; Bayley & Devilee 2010)。此外, 丙酮酸脱氢酶类似酶——二氢硫辛酸脱氢酶 (dihydrolipoyl dehydrogenase, O00087) 下调表达以及系列乙醇脱氢酶或乙醛脱氢酶 (如 aldehyde reductase 1, P27800) 上调表达, 表明微生物特异性代谢物乙醇代谢活跃, 猪苓菌核转向无氧呼吸, 处于缺氧胁迫 (hypoxia) 环境中。

感知刺激类功能相关蛋白在猪苓菌丝与菌核间差异表达 (图 2), 以热休克蛋白 104 (heat shock protein, P31539) 鞘氨醇长链激酶 (sphingoid long chain base kinase 5, Q06147) 和内皮素转化酶 (endothelin-converting enzyme 1, P42892) 为代表 (Boreham & Mitchel 1994; Jenkins & Hannun 2001; Olsen *et al.* 2006), 可感知来自细胞外、胞内内质网、热积累以及活性氧等刺激; 这类蛋白可

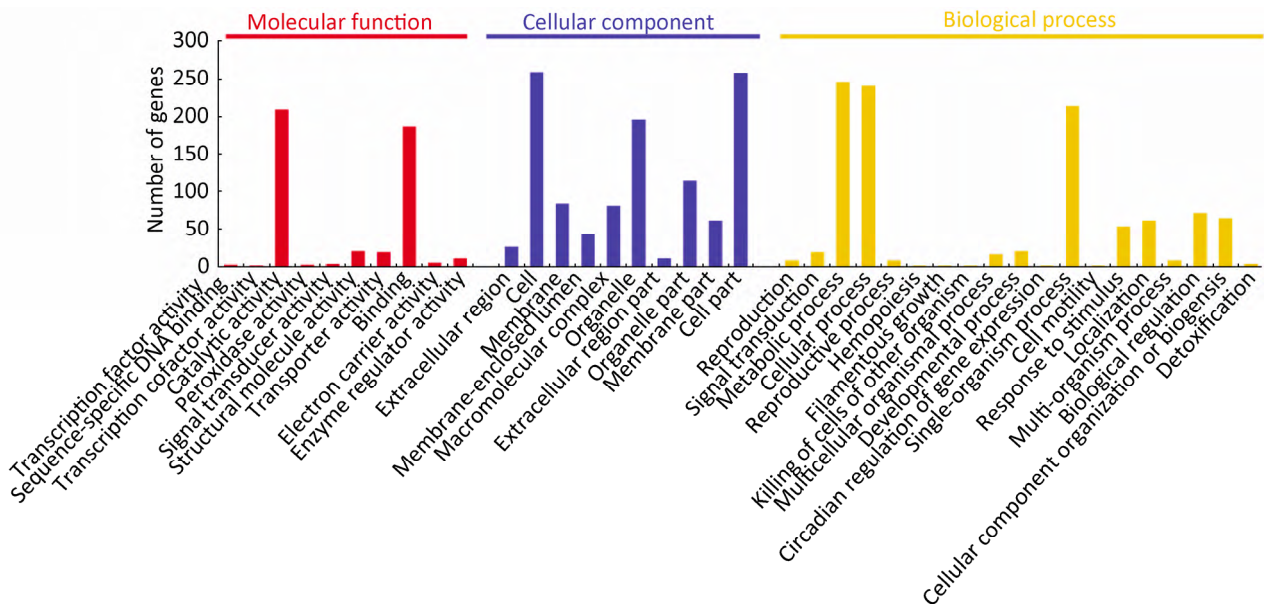


图 2 猪苓菌丝形成菌核差异蛋白 GO 注释结果

Fig. 2 GO analytic results of differential proteins between IS and IH.

以参与内质网蛋白加工、淀粉与蔗糖代谢、次级代谢产物代谢以及 RNA 转运等生物学过程,特别是内皮素转化酶还可以感知缺氧(hypoxia)。这些蛋白在猪苓菌丝与菌核中差异表达,表明猪苓菌丝形成菌核过程可能遭遇外界刺激。

一些信号转导相关蛋白在猪苓菌丝形成菌核的过程也差异表达(图2)。丝裂霉素活化蛋白激酶 SLT2/MPK1 (mitogen-activated protein kinase SLT2, Q00772)在猪苓菌核与菌丝中呈显著差异表达,属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是真核类生物信号传递通路(MAPK 通路)中的关键酶,在调控真核细胞形态和生长有关的信号转导中起重要作用。具有 ATP 结合、MAPK 激酶及蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性等细胞功能,参与信号转导、真菌细胞壁合成、真菌细胞壁组装与细胞大小调控及细胞核外信息向核内转导等多种生物学历程(图2)(Mazzoni *et al.* 1993)。该类蛋白在猪苓菌丝与菌核中差异表达,表明信号传递通路激活,细胞感知外界或胞内信号并将其向下游传导,引发系列级联反应。

与丝状菌丝生长相关蛋白也在猪苓菌丝与菌核间差异表达(图2),以顶端伸长异常蛋白1(tip elongation aberrant protein 1, P87061)为代表,是细胞极性蛋白。该类蛋白定位于细胞骨架特别是细胞顶端,参与胞内蛋白定植、调控丝状真菌菌丝生长、建立或维持可调控细胞形态的细胞单/双极性等生物学历程(Niccoli *et al.* 2003)。该蛋白在猪苓菌核中上调表达,表明其在调节猪苓菌核内部菌丝生长方向上起着重要作用,其具体历程有待深入研究。

与猪苓菌丝相比,与细胞壁有关的蛋白在猪苓菌核中的差异表达显著(图2),且数量较多。以多羟基磷酸甘露糖蛋白甘露糖基转移酶1(dolichyl-phosphate-mannose-protein mannosyltransferase 1, P33775)为代表的蛋白是一类合成O-糖基化蛋白的酶(Girrbach *et al.* 2000),参与细胞壁蛋白糖基化修饰代谢通路,其糖基化后的糖蛋白不仅参与

丝状真菌菌丝生长,而且参与真菌细胞壁组装等生物学过程。 α 葡萄糖苷酶 2 亚基(glucosidase 2 subunit alpha, Q9US55)(Fanchiotti *et al.* 1998)和 YMR196W 蛋白(protein YMR196W, Q04336)(Holt *et al.* 2009)是一类催化蛋白N-糖基化的酶,二者均涉及多糖代谢通路(图3),也具有碳水化合物结合功能(图2),参与蛋白N-糖基化修饰及加工等生物学历程。该类酶系的差异表达,表明蛋白O-或N-糖基化修饰差异显著,对调节蛋白功能起着重要作用。

以脂肪酸 β 氧化为代表的脂质代谢相关蛋白表达活跃(图2)。如长链乙酰CoA专一性脱氢酶(long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, P51174)是线粒体直链脂肪酸 β 氧化起始步骤的关键酶,具有调控ROS对膜损伤的频率、速度和程度的功能(Kurtz *et al.* 1998)。与初始期的菌丝相比,该酶在菌核中下调表达,表明脂肪酸氧化受到抑制,以减少膜受损。

猪苓菌丝形成菌核时,差异蛋白除参与碳源代谢、氧化、感知刺激、信号转导、丝状菌丝生长和胞壁合成调控等生物学历程外,还参与定植、胞器组织与生物合成、生殖发育等历程。从具体的细胞功能注释结果分析,猪苓菌核与菌丝间的大部分差异蛋白发挥着催化和结合的分子功能(图2)。

这些结果表明,猪苓菌丝形成菌核是对外界刺激的一种反应,导致机体内部处于氧化应激状态。菌丝形成菌核过程中蛋白表达活跃,是合成细胞相关组织及物质的高峰时期。

2.2.4 KEGG 通路分析:在GO注释的基础上,对差异蛋白参与的代谢通路进行进一步的分析。KEGG结果表明,大部分蛋白参与代谢通路,其中又以参与碳水化合物代谢蛋白(57个)和参与氨基酸代谢通路蛋白(59个)最多,分别有23个和14个蛋白参与脂质和能量代谢。49个蛋白参与基因信号处理过程(图3B),包括转录(3个)、翻译(22个)、复制与修复(6个)及折叠整理与降解(18

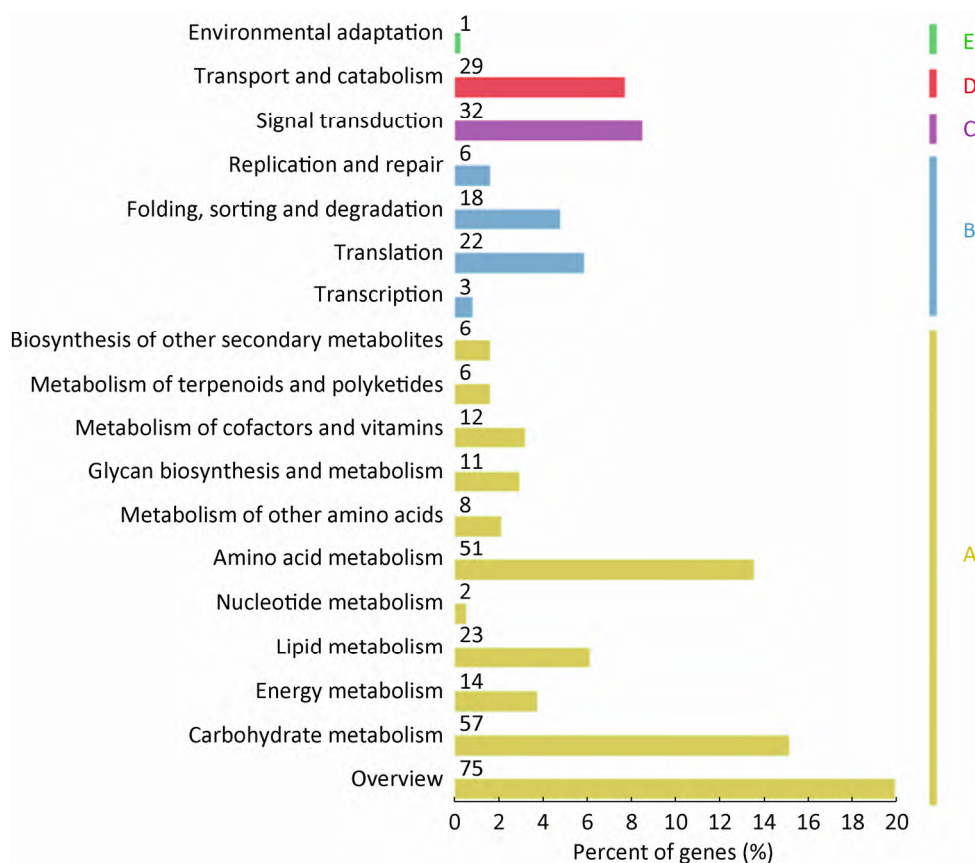


图 3 猪苓菌丝形成菌核差异蛋白质 KEGG 注释结果

Fig. 3 KEGG analysis results of differential proteins between IS and IH. A: Metabolism; B: Genetic information processing; C: Environmental information processing; D: Cellular processes; E: Organismal systems.

个)等蛋白表达全过程,说明菌丝形成菌核期间蛋白合成表达旺盛。32 个蛋白参与信号转导(图 3C)过程,29 个蛋白参与转运和催化通路(图 3D)。此外,还有一些蛋白参与甾醇、多聚乙酰以及其他类次级代谢产物的合成途径。

3 讨论

在正常机体内,活性氧的产生与清除处于动态平衡过程。当机体处于病理等情况时,自由基的清除速率降低,从而导致氧化应激状态。Georgiou 提出并证实了氧化应激启动了 *Sclerotinarolfisii* 菌丝分化成菌核的推论 (Georgiou 1997; Georgiou et al. 2000, 2006),猪苓菌丝形成菌核亦离不开活性

氧的参与及氧化应激状态。本研究中,基于 nano-LC/MS 的 DDA 模式,我们测定了猪苓菌丝形成菌核的初始期、生长期和成熟期菌丝和菌核的蛋白质组学,采用 SWATH 模式对初始期菌丝和菌核鉴定的蛋白进行了非标记定量,并获得了猪苓菌丝形成菌核差异表达的蛋白质。在此基础上,对差异蛋白进行了 GO 注释和 KEGG 分析,揭示了猪苓菌丝形成菌核可能是由于缺氧或温差等多种胁迫所致,诱导活性氧升高并形成氧化应激状态。胞外信号向胞内传递,可能促使了胞壁蛋白糖基化修饰,进而促进猪苓菌丝极性生长和菌丝形态学变化形成菌核,在此过程中伴随诸如甾醇、多聚乙酰等次级代谢物的合成。

诸如蜜环菌浸染及环境温差等多种外界刺激可以诱导猪苓菌丝形成菌核。本课题组研究发现,低温条件下温差的变化可以诱导和促进猪苓成核(Xing *et al.* 2013b)。本研究中,差异表达的热休克蛋白 104 (Hsp104) 可在机体遭受温差或其他环境刺激后对受损蛋白进行分解、复溶和再聚集(Wood *et al.* 2002),但并不能感知环境刺激(Boreham & Mitchel 1994)。三羧酸循环中的异柠檬酸脱氢酶 1 和 2 以及电子呼吸链复合体的亚基琥珀酸脱氢酶黄素蛋白 A 和 B 下调表达的同时,微生物特有的乙醇代谢活化证实机体处于缺氧环境中,而内皮素转化酶可感知缺氧环境。缺氧可能为诱导猪苓菌丝形成菌核的外界因素。本实验中菌丝成核约在接菌后的 30d,营养物质已有消耗,因此同时存在缺氧和(可能的)营养物质缺乏甚至其他环境胁迫,具体诱因需深入研究。

无论何种因素诱导了猪苓菌丝成核,活性氧物质富集及其所致的氧化应激与菌核形成有着直接的关系(Georgiou 1997)。猪苓菌丝形成菌核的过程中,检测到了诸如超氧负离子、过氧化氢等 ROS(夏洪燕和郭顺星 2002); NADPH 氧化酶(NOX)在猪苓菌核中上调表达(Xing *et al.* 2013a),在培养基中添加 NOX 抑制剂 DPI 后,菌丝成核数量减少、成核过程减慢甚至不成核:表明氧化应激是猪苓菌丝形成核的必要条件。机体为适应氧化应激环境,一方面下调脂肪酸 β 氧化,也升高乙醇代谢所产生的 NADPH,以调控 ROS 对膜和细胞损伤的频率、速度和程度,保证菌丝生长而不至于凋亡坏死(Kurtz *et al.* 1998)。此外,MAPK 信号转导通路中的丝裂霉素活化蛋白激酶 SLT2 在初始期猪苓菌核中上调表达,是初始期菌丝的 7.863 倍(刘蒙蒙等 2015),该蛋白在初始期的猪苓菌核中也上调表达,证实 ROS 通过 MAPK 途径将信号传递给下游。据 Zhao *et al.* (2013) 报道,烟曲霉菌丝极性生长与蛋白质 N-糖基化修饰有着密切的联系,糖基化修饰的蛋白可保证细胞壁合成酶正确折叠、转

运和发挥功能。在猪苓菌丝形成菌核的过程中,以顶端伸长异常蛋白 1 为代表的丝状菌丝生长相关蛋白上调表达,与此同时蛋白糖基化修饰被激活,表明细胞极性生长与蛋白糖基化修饰对促进猪苓菌丝形态学变化与形成菌核可能有着重要作用;前期形态学研究表明,实验室培养下的猪苓菌丝形成菌核过程中,会伴随着菌丝形态学的变化,菌丝与菌核之间形态学存在着显著的差异(Xing & Guo 2005),这种差异的物质基础是否与这些蛋白相关,需后续的深入研究。另外,氧化应激诱导菌丝形成菌核过程也是药用活性成分萜类及多聚乙酰(terpenoids and polyketides)多糖(polysaccharide)等次级代谢产物相关酶系活跃时期(图 3),药用活性次级代谢产物开始累积,其历程需实验验证。

[REFERENCES]

- Anon., 2015. Pharmacopoeia of PR China, Part 1. The State Pharmacopoeia Commission of PR China (eds.) Chinese Medical Science and Technology Press, Beijing. 1-489 (in Chinese)
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G, 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, 25(1): 25-29
- Bandara AR, Rapior S, Bhat DJ, Kakumyan P, Chamyuang S, Xu JC, Hyde KD, 2015. *Polyporus umbellatus*, an edible-medicinal cultivated mushroom with multiple developed health-care products as food, medicine and cosmetics: a review. *Mycologia*, 36(1): 3-42
- Bayley JP, Devilee P, 2010. Warburg tumours and the mechanisms of mitochondrial tumour suppressor genes. Barking up the right tree? *Current Opinion in Genetics & Development*, 20(3): 324-329
- Bhadauria V, Zhao WS, Wang LX, Zhang Y, Liu JH, Yang J, Kong LA, Peng YL, 2007. Advances in fungal proteomics. *Microbiological Research*, 162(3): 193-200

- Boreham DR, Mitchel REJ, 1994. Regulation of heat and radiation stress responses in yeast by hsp-104. *Radiation Research*, 137(2): 190-195
- Fanchiotti S, Fernández F, D'Alessio C, Parodi AJ, 1998. The UDP-Glc: glycoprotein glucosyltransferase is essential for *Schizosaccharomyces pombe* viability under conditions of extreme endoplasmic reticulum stress. *The Journal of Cell Biology*, 143(3): 625-635
- Georgiou CD, 1997. Lipid peroxidation in *Sclerotium rolfii*: a new look into the mechanism of sclerotial biogenesis in fungi. *Mycological Research*, 101(4): 460-464
- Georgiou CD, Patsoukis N, Papapostolou I, Zervoudakis G, 2006. Sclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induced by oxidative stress. *Integrative and Comparative Biology*, 46(6): 691-712
- Georgiou CD, Tairis N, Sotiropoulou A, 2000. Hydroxyl radical scavengers inhibit sclerotial differentiation and growth in *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani*. *Mycological Research*, 104(10): 1191-1196
- Girrbach V, Zeller T, Priesmeier M, Strahl-Bolsinger S, 2000. Structure-function analysis of the dolichyl phosphate-mannose: protein O-mannosyltransferase ScPmt1p. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(25): 19288-19296
- Guo SX, Wang QY, Zhuang WY, Zhang JH, Xing XK, 2002. Discovery and application of the companion fungus related to sclerotial formation from hyphae of *Grifola umbellata*. *Acta Botanica Sinica*, 44(10): 1151-1154
- Guzy RD, Sharma B, Bell E, Chandel NS, Schumacker PT, 2008. Loss of the SdhB, but not the SdhA, subunit of complex II triggers reactive oxygen species-dependent hypoxia-inducible factor activation and tumorigenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 28(2): 718-731
- Holt LJ, Tuch BB, Villén J, Johnson AD, Gygi SP, Morgan DO, 2009. Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution. *Science*, 325(5948): 1682-1686
- Huang HZ, Nichols A, Liu DJ, 2009. Direct identification and quantification of aspartyl succinimide in an IgG2 mAb by RapiGest assisted digestion. *Analytical Chemistry*, 81(4): 1686-1692
- Jenkins GM, Hannun YA, 2001. Role for *de novo* sphingoid base biosynthesis in the heat-induced transient cell cycle arrest of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(11): 8574-8581
- Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M, 2016. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Research*, 44(D1): D457-D462
- Kim Y, Nandakumar MP, Marten MR, 2007. Proteomics of filamentous fungi. *Trends in Biotechnology*, 25(9): 395-400
- King A, Selak MA, Gottlieb E, 2006. Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene*, 25(34): 4675-4682
- Kurtz DM, Tolwani RJ, Wood PA, 1998. Structural characterization of the mouse long-chain acyl-CoA dehydrogenase gene and 5' regulatory region. *Mammalian Genome*, 9(5): 361-365
- Liu MM, Song C, Xing YM, Guo SX, 2015. Molecular cloning and characterization of a MAPK gene from *Polyporus umbellatus*. *Microbiology China*, 42(12): 2345-2350 (in Chinese)
- Liu MM, Xing YM, Zhang DW, Guo SX, 2015. Transcriptome analysis of genes involved in defence response in *Polyporus umbellatus* with *Armillaria mellea* infection. *Scientific Reports*, 5: 16075
- Mazzoni C, Zarrov P, Rambourg A, Mann C, 1993. The SLT2 (MPK1) MAP kinase homolog is involved in polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 123(6): 1821-1833
- Niccoli T, Arellano M, Nurse P, 2003. Role of Tea1p, Tea3p and Pom1p in the determination of cell ends in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, 20(16): 1349-1358
- Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, Mann M, 2006. Global, *in vivo*, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*, 127(3): 635-648
- Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, et al., 2002. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, 415(6918): 871-880
- Xia HY, Guo SX, 2002. Signal transduction pathway of active

- oxygen species in *Polyporus umbellatus* induced by elicitor from *Armillaria mellea*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 34(3): 249-251 (in Chinese)
- Xing XK, Guo SX, 2005. Morphological characteristics of sclerotia formed from hyphae of *Grifola umbellata* under artificial conditions. *Mycopathologia*, 159(4): 583-590
- Xing YM, Chen J, Song C, Liu YY, Guo SX, Wang CL, 2013a. Nox gene expression and cytochemical localization of hydrogen peroxide in *Polyporus umbellatus* sclerotial formation. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(11): 22967-22981
- Xing YM, Guo SX, 2011. Effects of environmental factors on development of mycelial growth of *Polyporus umbellatus*. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 46(7): 493-495 (in Chinese)
- Xing YM, Yin WQ, Liu MM, Wang CL, Guo SX, 2015. Oxalic acid and sclerotial differentiation of *Polyporus umbellatus*. *Scientific Reports*, 5: 10759
- Xing YM, Zhang LC, Liang HQ, Lv J, Song C, Guo SX, Wang CL, Lee TS, Lee MW, 2013b. Sclerotial formation of *Polyporus umbellatus* by low temperature treatment under artificial conditions. *PLoS One*, 8(2): e56190
- Zhao W, Lü Y, Ouyang H, Zhou H, Yan J, Du T, Jin C, 2013. N-glycosylation of Gel1 or Gel2 is vital for cell wall β -glucan synthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Glycobiology*, 23(8): 955-968

[附中文参考文献]

- 刘蒙蒙, 宋超, 邢咏梅, 郭顺星, 2015. 猪苓菌丝形成菌核的 MAPK 基因克隆及表达分析. *微生物学通报*, 42(12): 2345-2350
- 夏洪燕, 郭顺星, 2002. 蜜环菌激发子诱导猪苓细胞活性氧产生的信号途径. *中草药*, 34(3): 249-251
- 邢咏梅, 郭顺星, 2011. 环境因子对猪苓菌丝体生长发育的影响. *中国药理学杂志*, 46(7): 493-495
- 中华人民共和国药典委员会, 2015. 中国药典一部. 北京: 中国医药科技出版社. 1-489

(本文责编: 韩丽)