

人蛋白酶体亚基 PSMB1 的重组表达、纯化及在蛋白酶体抑制剂体外筛选中的应用

范翠英^{1,2}, 冯利兴², 张冬梅², 潘素娜^{1,2}, 刘璇², 果德安², 樊金玲¹

1 河南科技大学食品与生物工程系, 河南 洛阳 471003

2 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203

范翠英, 冯利兴, 张冬梅, 等. 人蛋白酶体亚基 PSMB1 的重组表达、纯化及在蛋白酶体抑制剂体外筛选中的应用. 生物工程学报, 2012, 28(2): 233-242.

Fan CY, Feng LX, Zhang DM, et al. Expression, purification of proteasome subunit PSMB1 and application in screening of possible proteasome inhibitors. Chin J Biotech, 2012, 28(2): 233-242.

摘要: 蛋白酶体是真核细胞中的一类多亚基蛋白酶复合物, 它在胞内蛋白质降解的泛素-蛋白酶体通路中起关键作用。重组表达蛋白酶体的活性亚基可以用于在体外筛选、寻找具有蛋白酶体抑制剂作用的化合物。将人蛋白酶体催化亚基 (PSMB1) cDNA 的编码区 (全长 726 bp) 克隆至原核表达载体 pET28a(+), 构建重组质粒 pET28a-PSMB1, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 通过 1 mmol/L IPTG, 20 °C 过夜诱导, 获得相对分子量约为 27 kDa 的重组蛋白, 采用 IMAC 亲和层析柱纯化重组蛋白, 纯化后的重组蛋白纯度超过 95%。重组蛋白酶体经 NanoLC-MS/MS 鉴定表明所表达的融合蛋白氨基酸序列完全正确。在体外 BIAcore 分析中, 重组蛋白表现出对不同化合物的选择性结合能力, 其中与蛋白酶体抑制剂雷公藤红素的结合较强, 10 μmol/L 的雷公藤红素与重组蛋白的结合达到 27 RU, 并且具有良好的浓度依赖型。本研究建立了表达、纯化人蛋白酶体催化亚基 PSMB1 的方法, 并应用于具有蛋白酶体抑制活性化合物的体外筛选。

关键词: PSMB1, 原核表达, BIAcore, 体外筛选

Expression, purification of proteasome subunit PSMB1 and application in screening of possible proteasome inhibitors

Cuiying Fan^{1,2}, Lixing Feng², Dongmei Zhang², Suna Pan^{1,2}, Xuan Liu², De'an Guo¹, and Jinling Fan¹

1 College of Food & Engineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan, China

Received: June 28, 2011; Accepted: August 29, 2011

Corresponding author: Xuan Liu. Tel: +86-21-20231000-2221; Fax: +86-21-50272789; E-mail: lillianliu@yaho.com.cn

Jinling Fan. E-mail: fan20032006@yahoo.com.cn

2 Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China

Abstract: Proteasome is a multi-subunit protease complex in eukaryocytes, and plays an important role in ubiquitin-proteasome pathway. Recombinant proteasome can be used to screen proteasome inhibitors. In this study, recombinant plasmid of pET28a-PSMB1 was constructed by inserting human proteasome catalytic subunit (PSMB1) cDNA (726bp) into the prokaryotic expression vector pET28a(+), and transforming the plasmid into *E. coli* BL21(DE3) cells for expression. After overnight induction (1 mmol/L IPTG, 20 °C), an expected protein band with molecular weight of 27 kDa was observed on SDS-PAGE gel. The recombinant protein was then purified through affinity chromatography, and the purity is more than 95%. The amino acid sequence of the recombinant protein was validated by NanoLC-MS/MS. The data from *in vitro* BIAcore analysis showed that the recombinant PSMB1 could bind to celastrol. The binding affinity between PSMB1 and 10 μmol/L celastrol was more than 27RU.

Keywords: PSMB1, prokaryotic expression, BIAcore, screening *in vitro*

泛素-蛋白酶体通路 (Ubiquitin-proteasome pathway) 是真核细胞中蛋白质降解的重要途径。蛋白酶体 (Proteasomes) 普遍存在于所有真核细胞的细胞核和细胞质中, 最常见的蛋白酶体的形式是 26S 蛋白酶体, 由一个 20S 催化亚基与 2 个 19S 调节亚基组成, 对肽键的裂解作用是通过 20S 催化亚基 N 末端氨基酸残基的亲核反应来完成^[1]。拟降解的靶蛋白经过泛素化后, 先被 19S 亚单位识别, 随后进入 20S 催化中心被降解成 3~22 个氨基酸片段并释放出游离的泛素^[2]。

由于蛋白酶体参与降解细胞内多种目标靶蛋白, 因此其功能调节可以影响基因转录、细胞周期、信号转导及细胞凋亡等多种生理过程, 对基因的转录翻译、细胞的增殖、分化及恶变均有重要影响^[3-4]。因此蛋白酶体将成为影响细胞功能的重要药物靶标^[5]。例如, 寻找能够与 20S 催化亚基单位共价结合, 进而改变其酶切位点活性的蛋白酶体抑制剂已成为近年来恶性肿瘤治疗的研究热点。第一个进入临床的蛋白酶体抑制剂是英国剑桥 Millennium Pharmaceuticas

公司的二肽硼酸盐类药物硼替佐米 (Bortezomib)。这是一种缓慢作用于糜蛋白酶位点的可逆抑制剂。还有 2 种处于临床前研究的新药, salinosporamide A (NPI-0052, 圣地亚哥) 和 PR-171 (Proteolix, 旧金山)。其中 salinosporamide A 是口服药物, 它不同于硼替佐米, 是一种自然提取物, 类似于乳胞素, 能够不可逆地作用于蛋白酶体的活性亚基, 而且其对蛋白酶体催化活性的抑制具有特异性。PR-171 是一种合成的能够不可逆地作用于糜蛋白酶位点的抑制剂, 来源于环氧霉素, 是目前已知的选择性最强的蛋白酶体抑制剂。

重组表达蛋白酶体的活性亚基, 可以用于在体外高通量、快速地筛选可能具有蛋白酶体抑制作用的化合物。本研究构建了蛋白酶体 20S 催化亚基 PSMB1 (全长 726 bp) 的表达质粒, 在原核表达系统中实现 PSMB1 的可溶性表达, 利用固相化金属亲和层析 (Immobilized metal-affinity chromatography, IMAC) 柱对表达产物纯化, 获得了纯度较高的重组蛋白。质谱鉴定证实所表达的重组蛋白氨基酸序列完全正确。BIAcore

(Biomolecular interaction analysis) 分析表明 PSMB1 重组蛋白对不同化合物表现出差异的结合能力。本研究为建立以蛋白酶体为分子靶点筛选特异性抑制剂的体外筛选模型提供了纯化的 PSMB1 重组蛋白。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌菌株 DH5 α /BL21 (DE3) 购自北京全式金生物有限公司。表达载体 pET28a (+) 由本实验室保存。PSMB1 cDNA 购于 Thermo 公司。

1.1.2 酶和主要试剂

EcoR I、*Hind* III 限制性内切酶购于北京 NEB 公司。T4 DNA 连接酶、*Taq* 酶、PCR 试剂盒均购于 TaKaRa 公司。质粒提取及纯化试剂盒购于博大泰克生物基因技术有限公司。PCR 扩增引物及 DNA 测序由上海英骏生物技术有限公司完成。IPTG、卡那霉素为鼎国生物技术有限公司产品。固相化金属亲和层析 (Immobilized metal-affinity chromatography, IMAC) 柱购自上海 Bio-Rad 公司。二硫苏糖醇 (DTT) 和碘乙酰胺为 Sigma 公司产品, 甲酸 (FA) 购自美国 TEDIA 公司, 胰蛋白酶 (Trypsin) 购自美国 (Promega) 公司, 乙腈为色谱纯 (Honeywell)。其他试剂均为国产分析纯。其他试剂均为分析纯。

1.1.3 NanoLC-MS/MS 分析仪器

Tempo nano MDLC 色谱系统、质谱仪 (4000 QTRAP LC-MS/MS) 美国 Applied Biosystems 公司; C18 反相分析柱, MICHROM Magic C18 5 μ m

100 \AA 0.075 mm \times 150 mm 美国 MICHROM 公司。

1.2 方法

1.2.1 表达载体 pET28a-PSMB1 的构建

根据 GenBank 中 PSMB1 基因的编码序列 (Accession No. NM_002793. 3) 及表达载体 pET28a (+) 的多克隆酶切位点, 设计特异性引物: 上游: 5'-CGGAATTCATGTTGTCCTCTAC AGC CATGTATTC-3' (下划线为 *EcoR* I 酶切位点)。下游: 5'-CCCTCGAGCGTCCTTCCTTAA GGAAACAGTTTCCT-3' (下划线为 *Xho* I 酶切位点)。以 PSMB1 cDNA (全长 726 bp) 为模板, 扩增出目的基因。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 58 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。胶回收纯化的 PCR 产物采用 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切, 再经过电泳回收纯化后与经过同样处理的 pET28a (+) 连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 利用卡那霉素抗性筛选阳性克隆, 挑选单菌落, 小提质粒后经 PCR 及双酶切分析验证后, 进行 DNA 测序鉴定。

1.2.2 重组蛋白的可溶性表达

将构建成功的重组质粒 pET28a-PSMB1 转化感受态的大肠杆菌 BL21 (DE3), 挑选单菌落, 接种于 5 mL LB/Km (50 μ g/mL) 液体培养基, 1:100 扩大培养至 OD_{600} 约 0.8 左右, 加入终浓度 1.0 mmol/L IPTG 诱导培养 (20 $^{\circ}$ C), 每隔 1 h 分别取样, 5 h 后剩余菌体过夜诱导。次日, 离心收集菌体, 进行 SDS-PAGE 分析。其中以不加诱导剂的菌体为对照。

1.2.3 目的蛋白的纯化及 NanoLC-MS/MS 分析

诱导表达的菌体经离心收集后, 将沉淀

重悬于预冷的裂解缓冲液 (300 mmol/L KCl, 50 mmol/L KH_2PO_4 , 5 mmol/L 咪唑, pH 8.0), 超声破碎, 12 000 r/min 离心 30 min 后收集上清, 经 0.45 μm 膜过滤后用 Profinity IMAC 柱纯化。亲和柱先用结合缓冲液平衡 10 个柱体积, 上样流速为 1 mL/min, 然后依次用含 10 mmol/L、30 mmol/L 咪唑的洗涤缓冲液洗去柱子上非特异性结合的蛋白, 脱盐缓冲液 (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 4.3 mmol/L Na_2HPO_4 , 8.1 mmol/L KH_2PO_4 , pH 7.4) 脱盐, 最后用含 250 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液洗脱目的蛋白。依次收集穿透液 (1A)、洗杂液 (1B)、洗杂液 (1C)、洗脱液 (1D), 纯化的蛋白经超滤浓缩后以 Bradford 测定蛋白含量, 得到最终的目的蛋白。12% SDS-PAGE 分析目的蛋白。

1.2.4 NanoLC-MS/MS 分析

切取胶内目标蛋白条带, 用含 30% 乙腈/100 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 脱色, 真空干燥脱水。将新配制的 100 mmol/L DTT 的 100 mmol/L 碳酸氢铵溶液加入脱色干燥后的胶片管内, 使胶片水化。56 $^\circ\text{C}$ 水浴, 还原 1 h, 弃去 DTT 溶液, 加入乙腈放置 5 min 吸去, 真空干燥 15 min。加入 100 μL 55 mmol/L 碘乙酰胺的 100 mmol/L 碳酸氢铵溶液, 烷基化半胱氨酸残基上的巯基。室温暗室中放置 1 h, 弃去上清液, 重复上述步骤。在完全脱水的胶片中加入 10 ng/ μL 胰蛋白酶液适量, 4 $^\circ\text{C}$ 放置 30 min 使酶液完全吸收, 再补加 25 mmol/L 碳酸氢铵缓冲液适量, 37 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜。加入 100 μL 60% 乙腈/0.1 FA, 超声提取 15 min, 吸取上清液, 反复 3 次, 合并 3 次提取液, 真空浓缩至干。

采用 API 4000 Qtrap 串联四极杆-线性离子

阱质谱仪与在线 Tempo nano MDLC 色谱系统相连, 样品以 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速进样, 300 nL/min 流速冲洗脱盐。流动相 A 液: 98% 水, 2% 乙腈, 0.1% 甲酸; 流动相 B 液: 2% 水, 98% 乙腈, 0.1% 甲酸。液相洗脱梯度: 5% 2 min, 5%~10% 6 min, 10%~30% 42 min, 30%~50% 10 min, 50%~95% 15 min, 95% 20 min, 95%~5% 5 min, 5% 5 min。MS 选用 IDA (Information dependent acquisition) 阳离子模式, 仪器参数设置如下: Curtain gas (20), Ionspray voltage (2 300 V), Ion source gas (30), Interface heater temperature (150 $^\circ\text{C}$), Collision gas (High), Declustering potential (80), Entrance potential (10) and Collision cell exit potential (15)。第 1 级四极杆和第 3 级四极杆扫描分辨率设置为 "unit"; 选择目标离子传输窗口为 0.7 Da; 每对离子对处理时间为 50 ms。

1.2.5 BIAcore 分析重组 PSMB1 与雷公藤红素的结合活性

BIAcore 技术是基于一种表面等离子共振 (Surface plasmon resonance technology, SPR) 的物理光学现象的生物传感器分析技术, 它利用全反射时入射光可以和金属表面的等离子发生共振的原理, 探测生物分子之间是否发生作用以及反应的动力学参数。在研究两分子的相互作用时, 将一种分子固定在传感器表面, 而另一种分子的溶液流过其表面, 两种分子的结合会使传感器表面的折射率改变, 从而检测两分子间的相互作用。

本研究通过氨基偶联方法将 PMSB1 偶联到 CM5 芯片的 FC4 通道上。HBS-EP 作为工作缓冲液, PMSB1 用 10 mmol/L NaAC (pH 4.13) 1:15 稀释。芯片表面用 0.2 mol/L EDC (活化剂) 和

50 mmol/L NHS (活化剂) 1:1 混合以 10 μ L/min 的流速进样 7 min, 然后注射受体溶液, 以 1 mol/L 乙醇胺 (pH 8.5), 进样 7 min, 封闭活化的芯片表面。用 HBS-EP 缓冲液稀释待测配体浓度为 1 μ mol/L 和 10 μ mol/L, 离心后自动进样, 检测不同浓度配体与受体的结合活性。对有结合活性的配体进行详细的动力学实验。

2 结果

2.1 PSMB1 基因的 PCR 扩增

PCR 扩增 PSMB1 cDNA, 琼脂糖凝胶电泳可见一条大小约为 726 bp 的 DNA 条带, 与预期结果一致 (图 1)。

2.2 表达载体 pET28a-PSMB1 的构建及鉴定

成功构建重组表达质粒 pET28a-PSMB1, 经 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切后, 琼脂糖凝胶电泳分析可见约 726 bp 和 5 369 bp 两条带, 与预期结果相符 (图 2)。

2.3 重组蛋白 PSMB1 的诱导表达

pET28a-PSMB1 转化宿主菌 BL21 (*DE3*), IPTG 诱导后, 经 12% SDS-PAGE 分析可见一条分子量约为 27 kDa 的明显的新增表达条带。根据表达条带的浓度变化趋势选择过夜诱导为最佳培养时间 (图 3)。

2.4 表达蛋白的纯化

重组蛋白利用 IMAC 柱亲和纯化, 依次用不同浓度的咪唑洗脱, 分别收集穿透液、洗杂液、洗杂液 2、洗脱液进行 SDS-PAGE 分析。在上清与洗脱液洗脱后的回收液中均发现目标蛋白, 大小约为 27 kDa, 与预期结果吻合。纯化后的蛋白经超滤离心后, Bradford 测定蛋白含量为

3.5 g/L。上样 20 μ g, 几乎无杂带, 蛋白纯度大于 95% (图 4)。

2.5 NanoLC-MS/MS 分析 PSMB1 重组蛋白

从 SDS-PAGE 胶上切取 PSMB1 融合蛋白片段, 胶内酶解后, 进入 NanoLC-MS/MS 质谱分析, 实验获得的 MS/MS 数据由 ProteinPilotTM3.0 软件数据库进行自动处理, 蛋白鉴定置信度设置为 95%, 共检测到 34 个肽段。如表 1 所示。表明所表达的蛋白即为 PSMB1 融合蛋白。

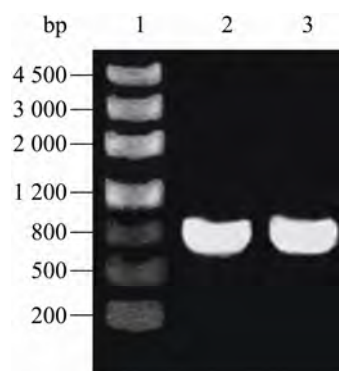


图 1 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products. 1: DNA marker (Marker III); 2: PCR product of PSMB1.

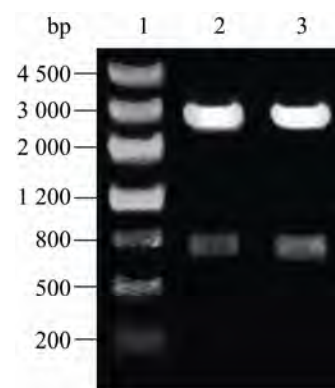


图 2 重组质粒 pET28a-PSMB1 酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pET28a-PSMB1 by enzyme digestion. 1: marker III; 2-3: pET28a-PSMB1 digested with *EcoR* I and *Xho* I.

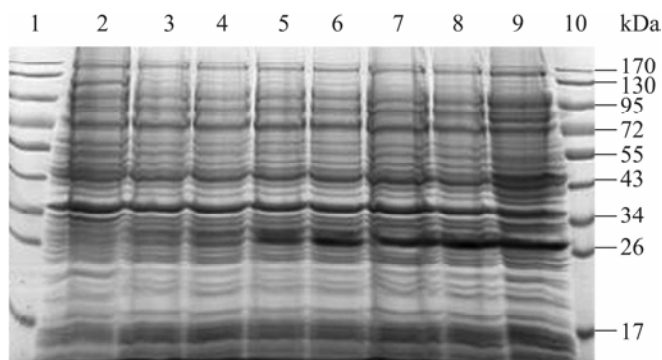


图 3 PSMB1 的诱导表达

Fig. 3 Induced expression of PSMB1. 1,10: marker; 2: total protein before induction; 3-9: total protein in 1-6 hours after induction; 10: total protein overnight induction.

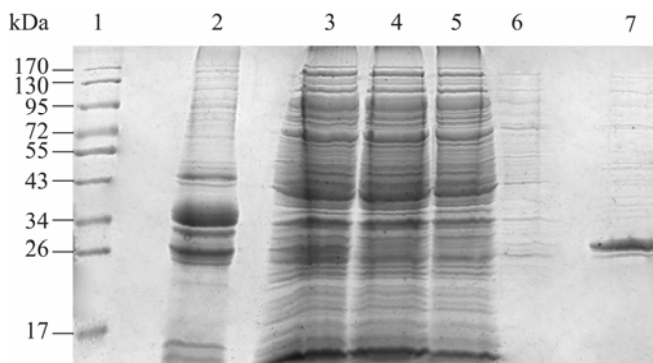


图 4 PSMB1 重组蛋白的纯化

Fig. 4 Purification of PSMB1 recombinant protein. 1: marker; 2: precipitate of cell lysate; 3: culture supernatant; 4: flowthrough (A); 5: wash (B); 6: wash (C); 7: concentrated purification protein (D).

图 5 是表 1 中序列为 DVFISAAER DVYTGDAER ($MH^{2+}=999.39$) 的 MS/MS 分析结果。

2.6 重组蛋白 PSMB1 与雷公藤红素的体外结合

BIAcore 初筛结果显示, 不同的化合物 (配体) 与受体 PSMB1 的结合能力各不相同, 结果见表 2。

其中, 雷公藤红素 (Celastrol) 与受体

PSMB1 最强, 响应值达 27RU, 且表现出浓度依赖性。不同浓度的雷公藤红素 (0、2.40、3.43、4.90、7.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$) 与 PSMB1 之间的相互作用如图 6 所示。图中从上到下的曲线依次是浓度由高到低的雷公藤红素在 PSMB1 表面流过的响应值。用 Biacore3000 分析软件中的 1:1 Langmuir 结合模型对图 6 的曲线进行拟合, 得到 k_a (1/Ms) 值为 15.7, k_d (1/s) 值为 0.0142, K_D ($\mu\text{mol/L}$) 为 903, Chi^2 为 1.09。

表 1 重组 PSMB1 蛋白 NanoLC-MS/MS 鉴定结果

Table 1 Identification of PSMB1 recombinant protein by NanoLC-MS/MS

Number	Sequence	Score
1	AGGSASAMLQPLLDNQVGFK	20
2	AMTTGAI AAMLSTILYSR	24
3	DVFISAAERDVYTG DALR	14
4	GAVYSFDPVGSYQR	19
5	KNMQNVEHVPLSLDR	19
6	LTDKTVIGCSGFHGDCLTLTK	16
7	LVKDVFISAAER	17
8	MYKHSNNKAMTTGAI AAMLSTILYSR	18
9	RFFPYVYVNIIGGLDEEGK	19
10	TVIGCSGFHGDCLTLTK	18
11	DVFISAAER	12
12	EGIREETVSLR	13
13	EGIREETVSLRK	12
14	FISAAERDVYTG DALR	13
15	PLLDNQVGFK	12
16	FFPYVYVNIIGGLDEEGK	12
17	TTGAI AAMLSTILYSR	13
18	SLDRAMRLVKDVFISAAER	13
19	LKMYKHSNNKAMTTGAI AAMLSTILYSR	13
20	RFFPYVYVNIIGGLDEEGKAVYSFDPVGSYQR	13
21	AMLSTILYSRRFFPYVYVNIIGGLDEEGK	12
22	DVFISAAERDVYTG DALR	12
23	FSPYVFNGGTILAIAGEDFAIVASDTR	19
24	KNMQNVEHVPLSLDR	15
25	NMQNVEHVPLSLDR	19
26	RFFPYVYVNIIGGLDEEGK	18
27	KHDKSASDALR	12
28	KRQSPEPSPVTLGR	12
29	DSLNSDCLTSFKITDLGK	12
30	AENTRLNAELLK	12
31	HSNNKAMTTGAI AAMLSTILYSR	11
32	NGFLLDGFPR	10
33	SVPA AEPEYPK	10
34	KEPKNLVWRDVSLGQTSRTPR	10

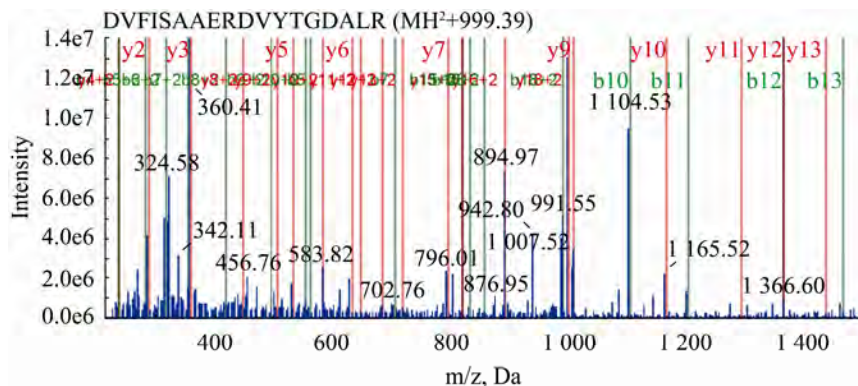


图 5 肽段 DVFISAAERDVYTG DALR ($MH^{2+}=999.39$) 的 MS/MS 图谱

Fig. 5 The MS/MS spectra from one of the identified peptides is shown (DVFISAAERDVYTG DALR ($MH^{2+}=999.39$)).

表 2 不同配体与 PSMB1 的结合能力比较

Table 2 The comparison of binding ability between different ligands and PSMB1

Ligands	MW	Response unit (RU)
GA	629	15
Clesterol	450	27
Bufalin	498	10
BF211	512	11
BF211-HCl	548	11

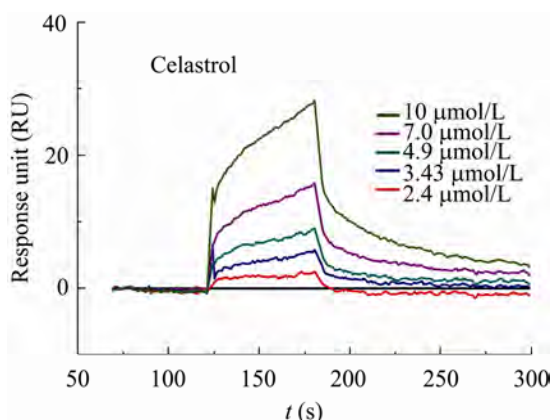


图 6 celastrol 与 PSMB1 结合的 BIAcore 分析

Fig. 6 BIAcore analysis of interactions between celastrol and PSMB1.

3 讨论

本研究选取带有六聚组氨酸标签的 pET28a (+) 原核表达载体, 实现了 PSMB1 在大肠杆菌 BL21 (*DE3*) 内的可溶性表达。由于 pET28a (+) 载体 N 端带有 His-tag 标签, 可以直接采用 Ni^{2+} 亲和和层析实现重组蛋白的纯化, 且组氨酸标签相对较小, 对融合蛋白结构影响小, 不需要从蛋白中切除。目的蛋白经 IPTG 诱导后以可溶性形式表达, 再利用 His 亲和柱对 PSMB1 重组蛋白直接进行纯化, 一步法纯化可达到 95% 以上的纯

度,可直接用于 BIAcore 分析,筛选潜在的具有蛋白酶体抑制剂活性的化合物。在本研究中,对重组 PSMB1 融合蛋白的氨基酸序列的鉴定采用的是 NanoLC-MS/MS 方法,蛋白鉴定置信度设置为 95%。该检测方法与常规的 Western blotting 等方法相比,检测快速、灵敏、准确,极大地提高了鉴定结果的可靠性。此外,蛋白酶体抑制剂筛选主要采用连续荧光监测法,通过测定蛋白酶体活性来寻找对蛋白酶活性影响的化合物,但该方法不能确证化合物是否与蛋白酶体发生结合,以及与哪个亚基结合。本研究中利用 BIAcore 直接检测蛋白酶体亚基与化合物小分子之间的相互作用,进而筛选特异性蛋白酶体抑制剂,无需借助任何标记物(酶标或荧光底物)也不需要对所研究蛋白质做任何修饰即可监测生物分子之间的相互作用^[6]。BIAcore 结果还可以提供关于结合反应的动态过程数据,且测量周期短,这些都是其他技术无法比拟的。

雷公藤红素(Celastrol)又名南蛇藤醇,是从雷公藤根分离到的三萜类色素^[7]。近年来因为其具有广谱的抗炎和抗氧化作用,被广泛地应用于哮喘、自身免疫性及神经性疾病的治疗^[8-15]。雷公藤红素还可以抑制肿瘤细胞增殖并诱导其死亡^[16-18]。有报道指出,雷公藤红素可以显著抑制大鼠 20S 中的 β_5 催化亚基及 PC-3、LNCaP 细胞中的 26S 蛋白酶体活性^[19],但其分子机制还不太清楚。本研究发现雷公藤红素可以作用于人 20S 蛋白酶体中的 PSMB1 催化亚基。这一发现为进一步深入研究雷公藤红素抑制蛋白酶体活性的分子机制提供了研究方向。

总之,本研究建立了重组表达、纯化人蛋白

酶体亚基 PSMB1 的方法,并初步试用于体外筛选具有蛋白酶体抑制作用的化合物。本研究结果为建立快速、高通量的蛋白酶体抑制剂筛选平台奠定了基础,同时也有助于对已知的蛋白酶体抑制剂进行作用机制研究。

REFERENCES

- [1] 顾光华,孔祥. 泛素蛋白酶体通路以及蛋白酶抑制剂对 NF- κ B 信号通路作用的研究进展. 实用临床医药杂志, 2009, 13(5): 114-116.
- [2] Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, 2002, 82(2): 373-428.
- [3] Ciechanover A. Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Cell Death Differ*, 2005, 12(9): 1178-1190.
- [4] Smalle J, Vierstra RD. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55(1): 555-590.
- [5] Adams J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(5): 349-360.
- [6] Deng HW, Guo Y, Sun Y, et al. A novel small molecule ligand for epidermal growth factor receptor targeting. *Prog Biochem Biophys*, 2005, 32(2): 180-186.
邓宏伟,郭妍,孙烨,等. 靶向表皮生长因子受体的全新小分子配体筛选. 生物化学与生物物理进展, 2005, 32(2): 180-186.
- [7] 程薇,马保根,张茵,等. 雷公藤红素抗肿瘤研究进展. 中国医药, 2008, 3(6): 383-384.
- [8] Tao X, Younger J, Fan FZ, et al. Benefit of an extract of *Tripterygium wilfordii* Hook F in patients with rheumatoid arthritis: a double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum*, 2002, 46(7): 1735-1743.
- [9] Li H, Jia YF, Pan DJ, et al. Effect of tripterine on

- collagen-induced arthritis in rats. *Acta Pharm Sin*, 1997, 18(3): 270–273.
- [10] Li H, Zhang YY, Huang XY, et al. Beneficial effect of tripterine on systemic lupus erythematosus induced by active chromatin in BALB/c mice. *Eur J Pharmacol*, 2005, 512(2/3): 231–237.
- [11] Xu X, Wu Z, Xu C, et al. Observation on serum anti-double stranded DNA antibodies of tripterine in systemic lupus erythematosus of (NZB×W) F1 mice. *Ann Rheum Dis*, 2003, 62(4): 377–378.
- [12] Liu RL, Liu ZL, Li Q, et al. The experimental study on the inhibitory effect of tripterine on airway inflammation in asthmatic mice. *Chin J Tuberc Respir Dis*, 2004, 27(3): 165–168.
- [13] Pinna GF, Fiorucci M, Reimund JM, et al. Celastrol inhibits pro-inflammatory cytokine secretion in Crohn's disease biopsies. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 322(3): 778–786.
- [14] Cleren C, Calingasan NY, Chen J, et al. Celastrol protects against MPTP- and 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity. *J Neurochem*, 2005, 94(4): 995–1004.
- [15] Allison AC, Cacabelos R, Lombardi VRM, et al. Celastrol, a potent antioxidant and anti-inflammatory drug, as a possible treatment for Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2001, 25(7): 1341–1357.
- [16] Chang FR, Hayashi K, Chen IH, et al. Antitumor agents. 228. Five new agarofurans, Reissantins A-E, and cytotoxic principles from *Reissantia buchananii*. *J Nat Prod*, 2003, 66(11): 1416–1420.
- [17] Zhou YX, Huang YL, Xu QN, et al. Several monomes from *Tripterygium wilfordii* inhibit proliferation of glioma cells *in vitro*. *Chin J Cancer*, 2002, 21(10): 1106–1108.
- [18] Nagase M, Oto J, Sugiyama S, et al. Apoptosis induction in HL-60 cells and inhibition of topoisomerase II by triterpene celastrol. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, 67(9): 1883–1887.
- [19] Yang HJ, Chen D, Cui QZC, et al. Celastrol, a triterpene extracted from the Chinese “Thunder of God Vine,” is a potent proteasome inhibitor and suppresses human prostate cancer growth in nude mice. *Cancer Res*, 2006, 66(9): 4758–4765.