

植物的核糖体失活蛋白及其应用

孙亚卿, 邵金旺, 张少英*

内蒙古农业大学甜菜生理研究所, 呼和浩特 010018

Ribosome-inactivating Protein (RIP) in Plants and Its Application

SUN Ya-Qing, SHAO Jin-Wang, ZHANG Shao-Ying*

Sugar Beet Physiological Institute, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China

提要: 对植物的核糖体失活蛋白的分类、性质、功能和应用的研究进展作概述。

关键词: 核糖体失活蛋白; N-糖苷酶; 抗病毒; 抗真菌

核糖体失活蛋白(ribosome-inactivating protein, RIP) 是一类广泛存在于高等植物细胞中的能专门作用于真核细胞损伤核糖体功能的毒蛋白, 具有对病毒、真菌和昆虫的广谱抗性, 其功能还在不断被发现之中。人们已经开展了 RIP 基因工程和蛋白质工程的研究, 对 RIP 进行了结构和功能的改造, 从而更大幅度地发挥了 RIP 的功能, 且在植物基因工程和医学研究中已取得有意义的进展, 有的已转化为应用成果在有效地为人类服务。

1 RIP 在植物中的分布、分类和性质

1.1 RIP 在植物中的分布 核糖体失活蛋白广泛分布于植物界, 在植株个体中含量丰富。RIP 首先是在蓖麻(*Ricinus communis*)种子中发现的, 即蓖麻毒蛋白(ricin)。除了在少数几种真菌和细菌中发现 RIP 外, 几乎所有的 RIP 均来自于高等植物。近年来人们还从真姬菇(*Lyophyllum shimeji*) (Lam 和 Ng 2001)和藻类(Liu 等 2002)中分离出 RIP。到目前为止, 人们已经从被子植物纲的 18 种单子叶植物和 122 种双子叶植物中检测到它的存在, 并命名了百余种 RIP。在植物不同组织(如根、茎、叶、种子、乳汁)中都发现有 RIP 的存在, 以种子含量为最高, 叶中含量较少。不同植物种子中的含量差异也很大, 有些含量很高, 如肥皂草素, 在肥皂草(*Saponaria officinalis*)种子中的含量达到蛋白质总量的 7%。同一植物不同组织, 甚至同一组织中同时有几种不同的 RIP, 如肥皂草的叶子中含有肥皂草素-L1、L2, 根中含有肥皂草素-R1、R2、R3, 种子中含有肥皂草素-S5、S6、

S8、S9; 春季的美洲商陆(*Phytolacca americana*)叶中含有商陆抗病毒蛋白(pokeweed antiviral protein, PAP), 夏季叶中含有商陆抗病毒蛋白-II (PAP-II), 种子中含有商陆抗病毒蛋白-S (PAP-S); 小麦(*Triticum aestivum*)种子中含有小麦毒蛋白(tritin)-s, 叶子中含有小麦毒蛋白-I; 同一植物不同品种间也有差异, 即使是在同种植物的同一种组织中, RIP 也经常以不同的亚型存在。所发现的 II 型 RIP 比 I 型少得多, 而且除了樟树(*Cinnamomum camphora*)和接骨木(*Sambucus elucus*)外, 很少有 I、II 两种类型的 RIP 在同一种植物中都存在的。

1.2 RIP 的分类 根据 RIP 的结构特性, 可以将核糖体失活蛋白分为 3 类(图 1): I 型、II 型和 III 型。

I 型 RIP 是单肽链蛋白, 分子量大约 11~30 可 kDa, 一般为碱性糖蛋白, 具有 RNA N-糖苷酶活性, 在活性位点区域内具有高度保守的活性裂隙残基和二级结构, 如天花粉蛋白(trichosanthin, TCS)、美洲商陆抗病毒蛋白、肥皂草素、丝瓜毒蛋白(luffin)、大麦翻译抑制剂(barley translational repressor, BTR)等。大多数核糖体失活蛋白属于 I 型。

II 型 RIP 是二聚体蛋白, 分子量大约为 60

收稿 2007-04-09 修定 2007-09-19
资助 国家自然科学基金(30440048)和内蒙古自然科学基金(200408020303)。

* 通讯作者(E-mail: syzh36@yahoo.com.cn; Tel: 0471-4301709)。

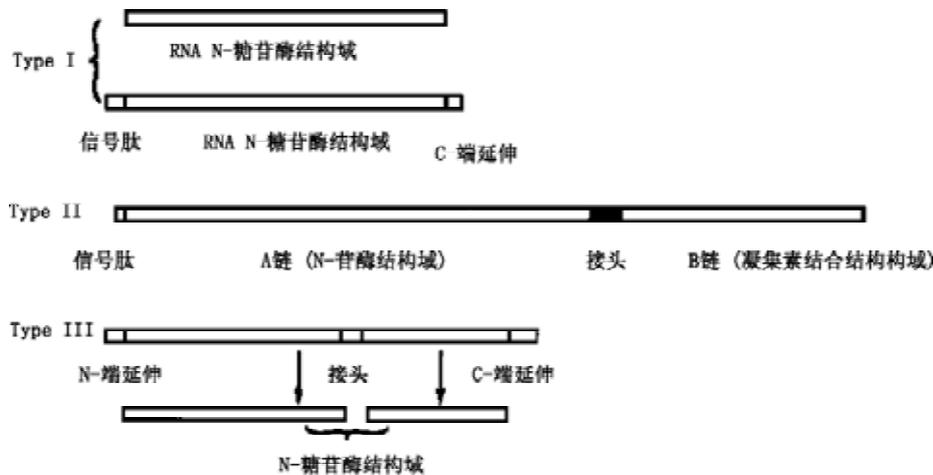


图1 核糖体失活蛋白的类型(Nielsen 和 Boston 2001)

kDa, A 链具有 RNA N-糖苷酶活性, B 链是一个对半乳糖专一的凝集素, B 链可以分别或同时与真核细胞表面的糖蛋白或糖脂的半乳糖部分结合, 介导 A 链逆向进入胞质溶胶, 一旦进入胞质溶胶, A 链就可以破坏核糖体, 并且抑制蛋白质的合成。A、B 这 2 条多肽链通过 1 对二硫键相连, 并通过强烈的疏水作用结合在一起。II 型的 RIP 仅在 6 科 8 种植物中发现, 如蓖麻毒蛋白、相思子毒蛋白(abrin)及辛纳毒蛋白(cinnamomin)。

III 型 RIP 是先合成无活性的前体(proRIP), 然后在涉及形成活性位点的氨基酸之间进行酶解加工。此类型并不常见, 到目前为止, 仅在玉米(*Zea mays*)和大麦(*Hordeum vulgare*)中鉴定出 III 型 RIP。而且 III 型 RIP 与 I 型 RIP 有相似性, 因此也可以按有无 B 链将 RIP 分为 2 类, 即 I 型和 II 型(Stirpe 2004)。II 型 RIP 的 A 链和 I 型 RIP 一般由 210~270 个氨基酸组成, 同源性为 17%~75%。虽然 RIP 的一级结构同源性不大, 但空间结构十分相似, RNA N-糖苷酶活性位点的位置也很相似(Monzigo 和 Collins 1993)。

1.3 RIP 的性质 单链蛋白分子量大约在 11~30 kDa, 为碱性蛋白, 等电点在 pH 8 以上, 多数是糖蛋白, 且糖蛋白类型相差很大。有少数不含糖, 如 PAP、肥皂草素和天花粉蛋白等。单链蛋白性质较稳定, 如石竹素(dianthin)和多白花树毒蛋白(gelonin)经反复 10 次的冰冻和融化或冰冻干燥, 活性不变, 多白花树毒蛋白与等量胰蛋白

酶或胃蛋白酶等水解酶处理过夜, 活性不变。II 型 RIP 分子量大约 60 kDa, A 链呈酸性或碱性。同一植物不同组织或者同一组织中的 RIP 有一定的同源性, 分子量、等电点和氨基酸组成都很接近, 但活性、含量、表达特性及所需辅助因子有所不同。以前认为 RIP 的产生并不是植物细胞生存所必需的, 后来发现 RIP 可由多种因素诱导表达, 如病原体入侵、环境压力(温度、渗透压)、植物衰老, RIP 会被诱导表达或其活性会增加。

2 RIP 的酶学活性

(1) RNA N-糖苷酶活性, RIP 的主要酶学性质是具有 RNA N-糖苷酶活力。它们能专一地水解真核细胞核糖体 28S rRNA 第 A4324 位上的腺嘌呤碱基与核糖之间的 N-C 糖苷键, 释放出 1 个腺嘌呤碱基, 从而阻遏延长因子 EF-2 与核糖体的结合, 抑制蛋白质的合成。植物中已发现的 I 型 RIP 和 II 型 RIP 的 A 链都具有 RNA N-糖苷酶活性。

(2) RNA 水解酶活性, 作为 RNA 水解酶型的典型例子, α -sarcin 是从巨曲霉菌(*Aspergillus giganteus*)中分离出来的一种特殊形式的 RIP。1982 年 Endo 与 Wool 发现 α -sarcin 是一种 RNase, 几乎水解所有生物(动物、植物、细菌和真菌)来源的核糖体 RNA。 α -sarcin 专一性切割 28S rRNA 的 G4325 和 A4326 之间的 1 个磷酸二酯键, 在 28S rRNA 的 3'-端切下一个长约 450 个核苷酸片段(α 片段), 从而使核糖体失活。除 α -sarcin 外, 1996

年, Parente 等从棒曲霉菌(*Aspergillus clavatus*)中分离的 clavin 也具有相同的水解酶活性。此外, 高等植物中也发现有 RNase 型 RIP 的存在, Xu 等(2004)从中国侧柏(*Platycladus orientalis*)种子中分离到一种独特的 RNase (Biota orientalis RNase), 其作用与 α -sarcin 相似, 在特定条件下, 可专一性切割 28S rRNA 的 C4453 和 A4454 之间的 1 个磷酸二酯键, 在 28S rRNA 的 3'-端切下一个长约 333 个核苷酸片段, 从而使核糖体失活。

(3)超螺旋环状 DNA 的酶活性, 1991 年 Li 等发现, 在常规酶切反应条件下, TCS 具有解旋与酶切 DNA 的活性。随着 TCS 用量的增加, 它将超螺旋环状 DNA 转变为环状, 继而转变为线状结构的 DNA。TCS 并不作用于线状 DNA, 这表明 TCS 对超螺旋环状 DNA 的识别是发生在空间结构水平上, 而不依赖于对核苷酸序列的专一性, 这与 DNA 限制性内切酶不同。He 和 Liu (2004)研究表明, 从樟树种子中得到的辛纳毒蛋白除了可以使 rRNA 失活外, 还可使超螺旋 DNA 转为缺口状和线状 DNA, 但其 N-端和 C-端缺失的突变体却无此功能, 由此可见, 辛纳毒蛋白 N-端和 C-端对超螺旋 DNA 的作用是必要的, 但其具体作用机制还有待进一步探讨。RIP 对 DNA 的酶活性是部分单链 RIP 抑制艾滋病病毒复制的可能机制之一。

(4)其他酶活性, 随着人们对核糖体失活蛋白的深入研究, 一些新的酶学活性相继得到揭示。1993 年 Barbieri 等曾报道, 美洲商陆毒素(PAP-R)、肥皂草毒素(saporin-6)的浓度较高时, 其对鼠肝核糖体 28S rRNA 有多个脱腺嘌呤位点, 最多可达 33 个。他们进一步的研究发现, 一些 RIP 还能脱去各种不同的 RNA 甚至 DNA 的嘌呤碱基, 因此有人建议将 RIP 重新命名为脱嘌呤核苷酶。也有少数报道如 Rajamohan 等(2001)报道美洲商陆毒素可以从大肠杆菌(*Escherichia coli*)、盐草(*Halophila ovalis*)和兔(*Ochotona gobiolaus*)的核糖体上释放鸟嘌呤。2000 年 Hudak 等报道, PAP 还具有脱带帽 mRNA 上的腺嘌呤的活性。1995 年秦聆等发现克木毒蛋白(camphorin)除了具有通常 RIP 的 RNA N-糖苷酶活性以外, 还具有超氧化物歧化酶(SOD)活性, Sharma 等(2004)从烟草叶片中分离到的 TRIP (一种类似于 RIP 的蛋白)也具有上

述双重活性, 但这些活性不具有普遍性, 还存在一些争论(Girbés 等 2004)。

3 RIP 的功能和作用机制

3.1 RIP 的功能

(1)抗病毒, 人们发现 RIP 具有抗病毒的特性已有 75 年的历史, 美洲商陆的叶子中分离的商陆抗病毒蛋白表现出的抗烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV) 的特性引起了人们的兴趣。随后发现其他 I 型 RIP 几乎都具有不同程度的抗烟草花叶病毒的能力。而且, 含天花粉蛋白和香石竹毒蛋白(dianthins) 基因的烟草(*Nicotiana tabacum*) 分别对萝卜花叶病毒(turnip mosaic virus, TuMV) 和非洲木薯花叶病毒(African cassava mosaic virus, AcMV) 具有抗性。

RIP 具有的抗病毒活性不仅是对植物病毒, 而且对动物细胞的 RNA 和 DNA 病毒、以及酵母的反转录病毒都起作用(Tumer 等 1999)。RIP 的抗病毒特性是十分复杂的, 而且, 不同的 RIP 对不同病毒的抗病毒机制可能是不同的。

RIP 对病毒的抗性是毋庸置疑的, 但其抗病毒的机制至今还没有确定的答案。由于病毒中并不含有以 GAGA 为中心的保守区域, 所以过去认为此种抗性是一种间接的作用, 但也有实验证明 RIP 可直接对病毒的 RNA 起作用(Hudak 等 2000)。RIP 的作用底物是多样的, 因此 RIP 直接对病毒作用也是有可能的。此外, 一些 RIP 大量存在于细胞壁和细胞膜之间, 它们可能在病毒进入细胞前就能直接与之作用, 阻止病毒对细胞的侵入, 起到抗病毒的作用。当然, 这种抗性也有可能是直接和间接的双重作用(Desmyter 等 2003)。

(2)抗昆虫和真菌, RIP 不仅对病毒具有抗性, 而且对真菌和昆虫也有抗性。Vigers 等(1991)研究发现, 真菌核糖体好像是 RIP 的敏感底物, 大麦、小麦的 RIP 能高效失活粗糙链胞菌(*Neurospora crassa*)的核糖体。大麦、黑麦(*Secale cereale*)、小麦、玉米(*Zea mays*)的 RIP 对多种真菌的生长有明显的抑制作用。但不同的真菌核糖体对 RIP 有不同的敏感性。另外, 真菌有细胞壁, 这是 RIP 进入真菌细胞作用的屏障。如果 RIP 与某些植物防御蛋白如几丁质酶、葡聚糖酶一起协同作用于真菌, 则其抑制真菌的能力就会

增加, 因为后2种酶具有破坏真菌细胞壁的作用, 从而有利于RIP进入真菌细胞发挥作用。在栝楼(*Trichosanthes kirilowii*)种子中还发现了一种具有RIP和几丁质酶活性的双功能酶。

RIP对昆虫有毒性作用, 但不同的昆虫类对RIP的敏感性也有区别。Gatehouse (1994)曾报道, 当食物中有0.0001%~0.001%的蓖麻毒蛋白、肥皂草素-S6时, 就可以使鞘翅目的四纹豆象(*Callosobruchus maculatus*)和棉铃象甲(*Anthonomus grandis*)致死; 但对鳞翅目的烟芽夜蛾(*Heliothis virescens*)和一种粘虫(*Spodoptera littoralis*)则无影响。Zhou等(2000)研究表明, 食物中含有的辛纳毒蛋白对螟蛉(*Helicoverpa armigera*)幼虫和蚊子(*Culex pipines*)的半致死浓度(LC₅₀)分别是1839 mg·mL⁻¹和168 mg·mL⁻¹。同是II型RIP, 蓖麻毒蛋白和辛纳毒蛋白对三龄期的家蚕(*Bombyx mori*)表现不同的毒性, 前者的LC₅₀要远远低于后者。

植物凝集素(lectin)含有糖基结合域, 能识别并结合动物细胞上的某些受体, 是高等植物中的一类重要的防御蛋白。II型RIP的B链具有凝集素活性, 有些I型RIP也可归入凝集素家族中, 而且发现RIP和植物凝集素可同时存在于同一植物中, 植物凝集素与RIP有一定的序列相似性。因此, RIP的抗虫性还有可能是因为RIP与昆虫细胞的某些特异性受体结合, 使昆虫产生不良反应, 阻止昆虫对植物的进一步侵害。

(3)其他生理功能, 到目前为止, 研究过的RIP大多数具有抗植物病虫害的活性, 它们是植物防御系统的一部分, 除此而外, RIP在植物中还有其调节细胞代谢和作为储存蛋白的生理功能。

调节细胞代谢: RIP是植物蛋白质合成的调节因子, 对细胞增殖有调节作用。在植物组织衰老、种子成熟或当植物组织受到外界的压力(如热或高渗透压)时, 这些组织中注定要死亡的细胞内就会出现RIP活性或者原有的RIP活性大大提高, 它们通过失活核糖体而终止蛋白质的合成, 调节细胞的代谢。RIP也可能直接作用于细胞中的各种RNA或者DNA, 使其脱腺嘌呤从而实现调节细胞代谢的作用。 储存蛋白: 有研究推测, 由于RIP富含谷氨酸, 它可能作为一种储存蛋白,

用作种子萌发早期的C源和N源(Motto和Lupotto 2004)。1976年Tully和Beevers在蓖麻种子中检测到, 蓖麻毒蛋白和储存蛋白含量在种子萌发时同时下降。张劲松和刘望夷(1994)认为, 辛纳毒蛋白在体内并没有表现出其在体外的抑制蛋白质合成的活性, 而是起一种储存蛋白的功能。

3.2 RIP的作用机制 RIP对动、植物以及酵母(*Candida*)、大肠杆菌核糖体RNA的作用位点具有同源性, 都位于核糖体大亚基RNA的3'端茎环结构中一个高度保守的sarcin/ricin结构域(S/R结构域), RIP通过切割该结构域一个单一的共价键, 导致核糖体失活, 抑制蛋白质生物合成, 最终杀死细胞(图2)。RIP除了能作用于核糖体大亚基rRNA外, 一些RIP的作用底物还可以是DNA、Poly(A)和mRNA等(Hudak等2000; Parikh等2002)。一些RIP还可以脱鸟嘌呤(Parikh等2002)。

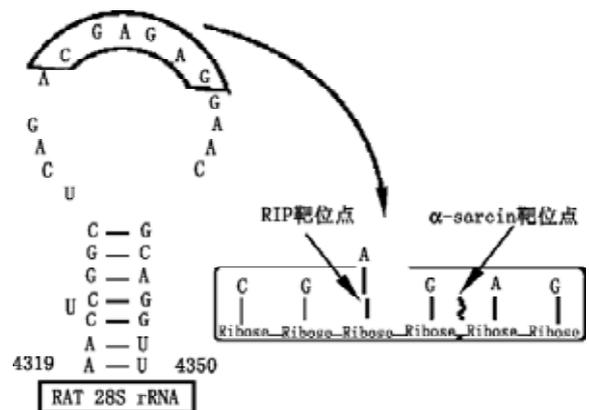


图2 核糖体失活蛋白的作用机制(Stirpe等1992)

不同来源的rRNA, 其RIP都有特异的作用方式, 而不同来源的核糖体对不同RIP的敏感性也不同。蓖麻毒蛋白与低聚寡核苷酸以及小麦核糖体作用时所需的蛋白量分别比杀死哺乳动物细胞所需的量高10⁴和10³倍; 从紫茉莉(*Mirabilis expansa*)根中分离出的RIP对畸雌腐霉(*Pythium irregulare*)敏感, 而对大豆腐霉(*Pythium ultimum*)不敏感; 从小麦叶片和种子中分别分离出的RIP, 对植物核糖体敏感性不同。核糖体对RIP的敏感性是一个动态过程, 核糖体经不同的处理后, 其对RIP的敏感性也随着变化, 当叶片经脱水处理36h或以茉莉酮酸甲酯诱导24h后制备核

糖体, 大麦中 III 型 RIP 可使其从多聚核糖体水解成单核糖体, 而对用水浸泡过的叶片组织所制备的核糖体则无作用(Nielsen 和 Boston 2001)。RIP 毒性的强弱取决于其是否容易接触到蛋白质合成过程, 例如 I 型 RIP 的毒性普遍较弱, 但它对巨噬细胞、滋养层细胞却有很强的毒性, 这可能由于这些细胞本身具有很强的胞饮作用, 很容易使 RIP 进入细胞内部抑制蛋白质合成。II 型 RIP 对植物细胞的毒性很低, 但却具有一定的抗病毒活性, 因为被病毒浸染的植物细胞对 RIP 的渗透性增强, RIP 很容易进入细胞, 进而抑制病毒的复制。

4 RIP 的应用

4.1 RIP 在植物基因工程中的应用 由于不同的 RIP 分别对病毒、真菌、昆虫具有不同的广谱抗性, 因此采用分子生物学手段将带有强启动子的 RIP 基因转入某些植物, 在转基因植株中组成型表达 RIP, 以提高植株的抗病虫能力, 这是研究的热点, 正日益发展成为防治植物病虫害的新途径。

利用 RIP 的抗性基因工程早在上世纪七十年代就有成功的报道, 到目前为止, 商陆、樟树、玉米、大麦、接骨木等不同来源的 RIP 相继被转入烟草、水稻(*Oryza sativa*)、小麦、番茄(*Lycopersicon esculentum*)等多种植物中, 体外和体内的实验结果表明 RIP 的抗病虫能力在转基因植株中都得到了不同程度的利用。

(1) 抗病毒基因工程, Lodge 等(1993)发现, 商陆抗病毒蛋白在烟草中适当的表达可以保护其免受病毒侵害, 高水平表达对烟草本身有毒害, 这一现象在芨草(*Cortaderia selloana*)植物中也有发现(Stirpe 2004)。Zoubenko 等(2000)将商陆抗病毒蛋白的 Gly-75 进行突变致无毒性后在烟草中表达, 但转基因烟草对病毒和真菌表现有抗性, 并且表达过程中没有引起酸性病程相关蛋白表达的提高, 而伤诱导蛋白激酶、蛋白酶抑制因子 II 被诱导, 说明突变体激活了一个不依赖水杨酸的、与胁迫有关的信号转导途径, 从而使植物获得对病原体的抗性。Chen 等(2002a)将接骨木中编码 II 型 RIP (SNA-I)的 cDNA 转入烟草后, 转基因烟草对病毒即产生抗性, 并且 SNA-I 的表达不影响植株的生

长和育性, 表达后病程相关蛋白的表达没有增加, 其抗病机制与 PAP 有差别。Chen 等(2002b)从接骨木的果实中分离出果实特异性复合 II 型 RIP (SNA-If)基因在烟草中能够正确表达、加工和组装, 但不改变烟草表型, 转基因烟草对病毒没有抗性, 说明该复合物在体内没有抗病毒作用。Krishnan 等(2002)将 TCS 基因转入烟草后, 获得抗黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus, CMV)和烟草花叶病毒的植株。

(2) 抗真菌基因工程, 1989 年, Logemann 等在马铃薯诱导基因 *wun1* 的启动子控制下将大麦胚乳 RIP 基因转入烟草, 可明显提高烟草对立枯丝核菌(*Rhizoctinia solani*)的抗性, 立枯丝核菌侵染时, 玉米胚乳胞质中 b-32 的转基因烟草以及表达商陆抗病毒蛋白(PAP-II)基因的烟草抗病性增强, 转基因烟草生长发育正常。在一种草坪草(*Agrostis palustris*) (Dai 等 2003)中表达 PAP, 转基因植株表现了对核盘菌(*Sclerotinia homoeocarpa*)的抗性, 而转突变体 PAP-C、PAP-Y 的植株虽生长表型正常, 但并不表现抗性。

有研究表明, RIP 与其他植物病程相关蛋白如几丁质酶、葡聚糖酶有很强的协同作用。1995 年, Jach 等将大麦中 3 种抗真菌蛋白基因——几丁质酶基因同 β -1,3 葡聚糖酶基因 *CHI/GLU* 和几丁质酶基因同核糖体失活蛋白基因 *CHI/RIP* 协同在转基因烟草中表达后, 烟草对土壤病原真菌立枯丝核菌的抗性大大提高。Kim 等(2003)将玉米的 RIP 基因(*MOD1*)与水稻的几丁质酶基因(*RCH10*)联合转入水稻中后, 转基因水稻对立枯丝核菌抗性即增强。几丁质酶和 β -1,3 葡聚糖酶可水解真菌的细胞壁, 从而解除了 RIP 进入真菌细胞的屏障, RIP 进入后外源核糖体特异地失活, 靶细胞蛋白质合成受抑, 真菌核糖体即可作为 RIP 的靶目标。将作用机制不同的抗真菌蛋白结合起来协同表达将拓宽转基因植物的抗菌谱并提高抗性的遗传稳定性。

(3) 抗虫基因工程, 转玉米 RIP 的烟草对昆虫有不同的抗性(Dowd 等 2003), 转基因二代植株表现对烟草甲虫(*Lasioderma serricorne*)、烟草天蛾(*Manduca sexta*)等几种昆虫的抗性, 昆虫死亡或存活者体重显著下降。子三代植株表现了更高

的抗性,除上述几种昆虫外,对玉米夜蛾(*Helicoverpa zea*)也表现抗性,且具有更高的死亡率。将玉米的RIP转入烟草后,转基因烟草对玉米夜蛾的抗性即增强。

但是,并不是所有的转RIP基因植株都表现抗性,而且转基因植株的正常生长特性有时也受到影响。转大麦RIP基因的小麦并没有表现出人们所期望的对白粉菌(*Erysiphe graminis*)的抗性(Oldach等2001)。Görschen等(1997)将从大麦中提取出的一种核糖体失活蛋白-JIP60的cDNA转入烟草后,转基因烟草出现生长缓慢、节间缩短、叶尖形、根数减少甚至早熟衰老等异常现象。表达商陆中一种RIP基因的烟草对TMV抗病性增强,但生长缓慢,有叶斑病,而且败育。Cho等(2001)从石竹(*Dianthus chinensis*)中分离出的RIP,在烟草中表达后可导致雄性不育。其原因可能是由于不同RIP对不同植物的核糖体敏感性不同所致。

4.2 RIP在医学中的应用 RIP除了直接抑制蛋白质生物合成外,还具有抗生育、抗艾滋病病毒和抑制肿瘤细胞生长等诸多生物活性,临床使用取得了较好的效果。人们从葫芦科植物中寻找一些与天花粉蛋白类似而抗原性不同的植物引产蛋白,临床医用效果较好。目前主要用于对天花粉蛋白进行结构改造(如聚乙二醇化)和用于中期引产及抗早孕(赵云利等2005;何贤辉等2000)。有报道来源于葫芦科及其他科的多种RIP(表1)有抗艾滋病病毒HIV的活性(陈本川2003)。用TCS及其他核糖体失活蛋白治疗艾滋病,是一个值得重视的领域。

表1 抗HIV的核糖体失活蛋白

名称	蛋白质分子量/kDa
栝楼根抗HIV蛋白29(TAP29)	29
苦瓜子抗HIV蛋白30(TAP30)	30
异株泻根毒蛋白	29
α -苦瓜子蛋白(α -MMC)	28
栝楼蛋白	27
美洲商陆抗病毒蛋白(PAP)	30
多白花树抗HIV蛋白(GAP31)	31
香石竹抗HIV蛋白30(DAP30)	30
香石竹抗HIV蛋白32(DAP32)	32

RIP除抗病毒外,也是一种可能有前途的抗肿瘤药物。临床证明天花粉蛋白对多种肿瘤细胞有显著的杀伤作用,治疗恶性滋养层细胞有一定的疗效(高富红等2005),王庆诚等(1987)的实验提示具有抗体活性的TCS21T在小鼠体内有明显增强特异性杀伤靶细胞的能力,且毒性作用低,比一般抗癌药物具有更好的安全性和有效性,在肿瘤治疗的临床研究中可能有一定的应用前景。

5 结语

核糖体失活蛋白及其酶活性机制的研究取得了不少进展,但仍然有很多问题尚无确切的解释,如RIP在体内是如何与它的底物——核糖体接触的;I型和III型RIP在缺少B链的作用下如何与靶细胞膜结合从而进入靶细胞的;RIP是如何抑制病毒和真菌侵染的;RIP的多种酶活性以及它对生物和非生物信号所做出的动态反应等一系列问题都有待探讨。

迄今人们对RIP抗病毒和抗真菌的作用机制还不十分清楚,已有的转基因研究结果表明,导入RIP基因可以为植物提供对病毒和真菌的广谱抗性。这对用有关的RIP基因进行作物抗病育种提供了一条可能的思路。

随着转基因技术的发展,基因的异位表达已成为研究基因功能和提高植物体抗性的有效手段。但如何提高RIP在植物体中的表达活性,如何促使转基因植物拥有产生RIP的天然植物所具有的自身保护机制,如何克服RIP作为免疫毒素所产生的副作用,这些在应用中也都是需要解决的问题。

参考文献

- 陈本川(2003). 抗HIV药物研究现状及发展趋势. 世界临床药物, 12: 18~20
- 高富红, 孙健, 吴国娟(2005). 天花粉蛋白抗肿瘤作用机理研究概况. 动物医学进展, 1: 21~24
- 何贤辉, 孙荃, 曾耀英, 徐丽慧, 邵鹏柱, 谭兆祥(2000). 天花粉蛋白结构改造对引产活性的影响. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 4: 34~37
- 秦聆, 凌俊, 阮康成, 刘望夷(1995). 克木毒蛋白三种酶活性与色氨酸残基的关系. 生物化学与生物物理进展, 22 (2): 177~178
- 王庆诚, 张振范, 王瑾, 谢弘, 杨正洪(1987). 天花粉蛋白及其与抗体的复合物对蛋白质合成的抑制作用. 实验生物学报, 20: 515~519

- 张劲松, 刘望夷(1994). 核糖体 RNA 拓扑学与 RNA N-糖苷酶研究进展. 生物化学与生物物理进展, 21 (1): 15~19
- 赵云利, 戎隆富, 戴敏, 王荣海, 宋礼华(2005). 聚乙二醇化天花粉蛋白抗生育活性及其过敏反应试验. 生殖与避孕, 10: 18~20
- Barbieri L, Battelli MG, Stirpe F (1993). Ribosome-inactivating protein from plants. Biochem Biophys Acta, 1154: 237~282
- Chen Y, Peumans WJ, van Damme EJ (2002a). The *Sambucus nigra* type-2 ribosome-inactivating protein SNA-I⁺ exhibits in planta antiviral activity in transgenic tobacco. FEBS Lett, 516: 27~30
- Chen Y, Vandenbussche F, Rouge P, Proost P, Peumans WJ, van Damme EJ (2002b). A complex fruit-specific type-2 ribosome-inactivating protein from elderberry (*Sambucus nigra*) is correctly processed and assembled in transgenic tobacco plants. Euro J Biochem, 269: 2897~2906
- Cho HJ, Kim S, Kim M, Kim BD (2001). Production of transgenic male sterile tobacco plants with the cDNA encoding a ribosome inactivating protein in *Dianthus sinensis* L. Mol Cells, 11 (3): 326~333
- Dai WD, Bonos S, Guo Z, Meyer WA, Day PR, Belanger FC (2003). Expression of pokeweed antiviral proteins in creeping bentgrass. Plant Cell Rep, 21: 497~502
- Desmyter S, Vandenbussche F, Hao Q, Proost P, Peumans WJ, van Damme EJ (2003). Type-I ribosome-inactivating protein from iris bulbs: a useful agronomic tool to engineer virus resistance? Plant Mol Biol, 51 (4): 567~576
- Dowd PF, Zuo WN, Gillikin JW, Johnson ET, Boston RS (2003). Enhanced resistance to *Helicoverpa zea* in tobacco expressing an activated form of maize ribosome inactivating protein. J Agric Food Chem, 51: 3568~3574
- Endo Y, Wool IG (1982). The site of action of alpha-sarcin on eukaryotic ribosomes. The sequence at the alpha-sarcin cleavage site in 28 S ribosomal ribonucleic acid. J Biol Chem, 257 (15): 9054~9060
- Gatehouse AM, Hilder VA, Powell KS, Wang M, Davison GM, Gatehouse LN, Down RE, Edmonds HS, Boulter D, Newell CA et al (1994). Insect-resistant transgenic plants: choosing the gene to do the 'job'. Biochem Soc Trans, 22 (4): 944~949
- Girbés T, Ferreras JM, Arias FJ, Stirpe F (2004). Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating protein in plants, fungi and bacteria. Mini Rev Med Chem, 4: 461~476
- Görschen E, Dunaeva M, Hause B, Reeh I, Wasternack C, Parthier B (1997). Expression of the ribosome-inactivating protein JIP60 from barley in transgenic tobacco leads to an abnormal phenotype and alterations on the level of translation. Planta, 202 (4): 470~478
- He WJ, Liu WY(2004). Both N- and C-terminal regions are essential for cinnamomin A-chain to deadenylate ribosomal RNA and supercoiled double-stranded DNA. Biochem J, 377 (Pt 1): 17~23
- Hudak KA, Wang P, Tumer NE (2000). A novel mechanism for inhibition of translation by pokeweed antiviral protein: depurination of the capped RNA template. RNA, 6 : 369~380
- Jach G, Gornhardt B, Mundy J, Logemann J, Pinsdorf E, Leah R, Schell J, Maas C (1995). Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. Plant J, 8: 97~109
- Kim JK, Jang IC, Wu R, Zuo WN, Boston RS, Lee YH, Ahn IP, Nahm BH (2003). Co-expression of a modified maize ribosome-inactivating protein and a rice basic chitinase gene in transgenic rice plants confers enhanced resistance to sheath blight. Transgenic Res, 12: 475~484
- Krishnan R, McDonald KA, Dandekar AM, Jackman AP, Falk B (2002). Expression of recombinant trichosanthin, a ribosome-inactivating protein in transgenic tobacco. J Biotechnol, 97: 69~88
- Lam SK, Ng TB (2001). First simultaneous isolation of a ribosome inactivating protein and an antifungal protein from a mushroom (*Lyophyllum shimeji*) together with evidence for synergism of their antifungal effects. Arch Biochem Biophys, 393: 271~280
- Li MX, Yeung HW, Pan LP, Chan SI (1991). Trichosanthin, a potent HIV-1 inhibitor, can cleave supercoiled DNA *in vitro*. Nucleic Acids Res, 19 (22): 6309~6312
- Liu RS, Yang JH, Liu WY (2002). Isolation and enzymatic characterization of lamjapin, the first ribosome inactivating protein from cryptogamic algal plant. Euro J Biochem, 269: 4746~4752
- Lodge JK, Kaniewski WK, Tumer NE (1993). Broad-spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein. Proc Nat Acad Sci USA, 90: 7089~7093
- Logemann J, Lipphardt S, Lörz H, Häuser I, Willmitzer L, Schell J (1989). 5' upstream sequences from the wun1 gene are responsible for gene activation by wounding in transgenic plants. Plant Cell, 1: 151~158
- Monzingo AF, Collins EJ (1993). The structure of pokeweed antiviral protein. J Mol Biol, 233: 705~715
- Motto M, Lupotto E (2004). The genetics and properties of cereal ribosome-inactivating proteins. Mini Rev Med Chem, 4 (5): 493~503
- Nielsen K, Boston RS (2001). Ribosome-inactivating protein: a plant perspective. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol,

- 52: 785~816
- Oldach KH, Becker D, Lörz H (2001). Heterologous expression of genes mediating enhanced fungal resistance in transgenic wheat. *Mol Plant Microbe Interact*, 14 (7): 832~838
- Parente D, Raucci G, Celano B, Pacilli A, Zanoni L, Canevari S, Adobati E, Colnaghi MI, Dosio F, Arpico S et al (1996). Clavin, a type-I ribosome-inactivating protein from *aspergillus clavatus* IFO 8605. cDNA isolation, heterologous expression, biochemical and biological characterization of the recombinant protein. *Eur J Biochem*, 239 (2): 272~280
- Parikh BA, Coetzer C, Tumer NE (2002). Pokeweed antiviral protein regulates the stability of its own mRNA by a mechanism that requires depurination but can be separated from depurination of the alpha-sarcin/ricin loop of rRNA. *Biol Chem*, 277: 41428~41437
- Rajamohan F, Ozer Z, Mao C, Uckun FM (2001). Active center cleft residues of pokeweed antiviral protein mediate its high-affinity binding to the ribosomal protein L3. *Biochemistry*, 40: 9104~9114
- Sharma N, Park SW, Vepachedu R, Barbieri L, Ciani M, Stirpe F, Savary BJ, Vivanco JM (2004). Isolation and characterization of an RIP (ribosome-inactivating protein)-like protein from tobacco with dual enzymatic. *Plant Physiol*, 134 (1): 171~181
- Stirpe F, Barbieri L, Battelli MG, Soria M, Lappi DA (1992). Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Biotechnology*, 10: 405~412
- Stirpe F (2004). Ribosome-inactivating protein. *Toxicon*, 44: 371~383
- Tully RE, Beevers H (1976). Protein bodies of castor bean endosperm: isolation, fractionation, and the characterization of protein components. *Plant Physiol*, 58 (6): 710~716
- Tumer NE, Hudak K, Di R, Coetzer C, Wang P, Zoubenko O (1999). Pokeweed antiviral protein and its applications. *Curr Top Microbiol Immunol*, 240: 139~158
- Vigers AJ, Roberts WK, Selitrennikoff CP (1991). A new family of plant antifungal proteins. *Mol Plant Microbe Interact*, 4 (4):315~323
- Xu H, He WJ, Liu WY (2004). A novel ribotoxin with ribonuclease activity that specifically cleaves a single phosphodiester bond in rat 28S ribosomal RNA and inactivates ribosome. *Arch Biochem Biophys*, 427: 30~40
- Zhou X, Li XD, Yuan JZ, Tang ZH, Liu WY (2000). Toxicity of cinnamomin—a new type II ribosome-inactivating protein to bollworm and mosquito. *Insect Biochem Mol Biol*, 30 (3): 259~264
- Zoubenko O, Hudak K, Tumer NE (2000). A non-toxic pokeweed antiviral protein mutant inhibits pathogen infection via a novel salicylic acid-independent pathway. *Plant Mol Biol*, 44: 219~229