

植物中的核糖体失活蛋白及其抗病毒机制

张智 孙素荣 马纪 张富春*

新疆大学生命科学与技术学院分子生物重点实验室, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046

The Ribosome-inactivating Proteins and Their Antiviral Mechanism in Plants

ZHANG Zhi, SUN Su-Rong, MA Ji, ZHANG Fu-Chun*

Key Laboratory of Molecular Biology, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, Urumqi 830046, China

提要 植物中的核糖体失活蛋白是一类分布于植物体内的毒蛋白, 其作用于真核细胞大亚基 28S 导致核糖体失活, 抑制蛋白质的生物合成, 从而对细胞产生毒害作用。文章简述了植物核糖体失活蛋白的酶活性和抗病毒的可能分子机制。

关键词 核糖体失活蛋白; 酶活性; 抗病毒; 植物防御

核糖体失活蛋白(ribosome-inactivating proteins, RIPs)是一类主要分布于植物体内的毒蛋白, 具有 RNA *N*-糖苷酶(RNA *N*-glycosidase)活性。RIPs 作用于真核细胞大亚基 28S 导致核糖体失活, 抑制蛋白质的生物合成, 从而对细胞产生毒害作用。根据 RIPs 的一级结构和功能, 可以将 RIPs 分为三型。I 型 RIPs 为单链结构, 具有 RNA *N*-糖苷酶活性, 本身是活性链, 分子量约 30 kD, 等电点在 8~10, 大多为碱性糖蛋白, 比较稳定。其中, 比较熟知的是天花粉毒蛋白(trichosanthin, TCS)和商陆抗病毒毒蛋白(pokeweed antiviral protein, PAP)等。II型RIPs则由2条多肽链通过分子间的二硫键组成(分为A链和B链), 分子量 60~65 kD。A链具有 RNA *N*-糖苷酶活性, 是活性链; 而B链具有凝集素功能, 能与细胞膜上的特异性糖基发生结合作用^[1], 促使活性链A链进入到细胞内, 对细胞造成毒性。在 II 型 RIPs 中研究较多的是蓖麻毒蛋白(ricin)^[2]。III型RIPs 包括大麦 JIP60 和玉米 RIP1(b-32)两种。JIP60 分子量为 60 kD, 其氨基端表现 RNA *N*-糖苷酶活性, 而羧基端功能还不清楚。玉米 RIP1(b-32)以没有活性的前体 proRIP1 存在, proRIP1 经过蛋白酶加工, 去除掉其氨基端和羧基端及肽中部分氨基酸残基后, 才具有活性。

RIPs 广泛分布于高等植物, 在真菌和细菌中也有发现。自蓖麻毒蛋白得到分离纯化以来, 已从 50 多种高等植物获得了 RIPs^[1]。分离的 I 型 RIPs 来自 9 个科约 30 多种植物, 广泛分布于葫芦科、

商陆科、大戟科、樟科等科; II 型 RIPs 较少, 主要分布在大戟科、石竹科、樟科、桑寄生科、忍冬科、毛茛科、百合科等科。大戟科和樟科植物同时存在 I 型和 II 型 RIPs。各种 RIPs 一级结构相关性在 17.5%~75% 之间, 不同科属来源的 RIPs 一级结构相关性较小, 而同科属的 RIPs 一级结构相关性较大; I 型和 II 型的 A 链具有一定的相关性, 因此认为植物 RIPs 具有系统进化关系。研究表明, RIPs 具有广谱的抗病毒活性^[3], 有些 RIPs 还表现出对真菌、昆虫等的抑杀作用。由于 RIPs 在植物中表现抗病毒、抗真菌等病原入侵的生理功能, 因此在医学上用来开发免疫毒素^[4]、流产药物^[5]、抗 AIDS^[6]、抗肿瘤^[7]等药物, 在农业生产中通过遗传转化已培育出转基因抗病毒植物^[8]。本文介绍 RIPs 的多种酶活性并探讨其在植物抗病毒作用中的可能机制。

1 RIPs的酶学机制

1.1 RIPs的RNA *N*-糖苷酶活性 RIPs按作用方式可以分为两类: RNA 水解酶(RNase)型和 RNA *N*-糖苷酶型。RNA 水解酶型(如帚曲霉素)RIPs 专一水解 28S rRNA 的 G₄₃₂₅~A₄₃₂₆ 位间的磷酸二酯键, 在 28S rRNA 的 3' 端切下一长约 500 个核苷酸片段, 从而使核糖体失活, 抑制蛋白质的生物合成。本

收稿 2004-11-11 修定 2005-06-09

资助 国家科技攻关西部科技行动项目(2001BA901A32)和浙江大学思源天然药物与生物毒素研究基金。

*通讯作者(E-mail: zfc@xju.edu.cn, Tel: 0991-8583259)。

文所介绍的植物中的RIPs为RNA N-糖苷酶型,专一水解真核细胞核糖体28S rRNA的A₄₃₂₄位腺苷酸的糖苷键,释放出1个腺嘌呤碱基,阻断蛋白合成延伸因子EF-II^[9]和真核生物翻译起始因子eIF5B^[10]与核糖体的结合,抑制蛋白质的生物合成。两类RIPs在rRNA上的作用位点仅相差1个核苷酸,这两个相邻的核苷酸位点位于一个富含GAGA高度保守序列的茎环结构之中,该区域称为sarcin/ricin结构域(S/R结构域)。

Endo等^[11,12]在研究II型RIPs蓖麻毒蛋白A链的作用中,首次阐明了它的RNA N-糖苷酶的作用机制。他们发现该蛋白的A链能特异性修饰28S rRNA,导致28S rRNA对酸性苯胺表现极为敏感而不稳定,释放一个近500 bp长的RNA片段,该片段的5'端是G₄₃₂₅。同时,化学定量检测发现,蓖麻毒蛋白A链能从1 mol的28S rRNA上释放0.78~0.84 mol的腺嘌呤,从而推断蓖麻毒蛋白A链是作用于28S rRNA第A₄₃₂₄位(大鼠)的N-C糖苷键,并释放出腺嘌呤,其后位于A₄₃₂₄与G₄₃₂₅之间的磷酸二酯键对酸性苯胺敏感发生水解作用,导致核糖体失活。

Zhang和Liu^[13]研究天花粉毒蛋白TCS的分子作用机制时,证实TCS具有Endo等^[11,12]提出的RNA N-糖苷酶作用机制。

1.2 RIPs的多核苷酸:腺苷糖苷酶(polynucleotide: adenosine glycosidases, PAG)活性 随着对RIPs研究的深入,人们发现RIPs不仅能从核糖体RNA的A₄₃₂₄位(大鼠)上释放腺嘌呤,而且能从核糖体RNA的多个位点和从不同来源的RNA或DNA核酸分子上释放腺嘌呤,因此认为用PAG来描述可能更合适些^[14]。

Barbieri等^[15]的实验提示,肥皂草毒蛋白(saporins)、PAP、栝楼毒蛋白(trichokirin)等能从家蝇和大鼠核糖体上释放出比1 mol核糖体还多的腺嘌呤,其中,肥皂草毒蛋白能从1 mol核糖体上释放近33 mol的腺嘌呤。因此认为RIPs具有从核糖体RNA多个腺嘌呤位点释放腺嘌呤的酶活性。Barbieri等^[14]研究52种RIPs(包括I型和II型RIPs)对不同来源的DNA或RNA[鲱鱼精细胞DNA、大肠杆菌(*Escherichia coli*)的Poly(A)和rRNA、烟草花叶病毒(TMV)的基因组RNA]酶活

性时发现,尽管不同的RIPs有不同的酶活力,但是几乎所有的RIPs都能不同程度从hsDNA和rRNA上释放腺嘌呤,肥皂草毒蛋白等RIPs还能从poly(A)上释放腺嘌呤。后来,Barbieri等^[16]还发现,肥皂草毒蛋白L1能作用于来源于人外周血淋巴细胞的核染色质DNA和线粒体DNA,释放腺嘌呤;商陆抗病毒蛋白(PAP-I、PAP-II、PAP-III)能作用于HIV-1、TMV、噬菌体MS2 RNA等病毒核酸释放腺嘌呤^[17]。Parikh等^[18]和Vepachedu等^[19]的研究发现,PAP和ME1(从紫茉莉科紫茉莉属的*Mirabilis expansa*中分离到的一种I型RIPs)等RIPs还能通过脱去自身mRNA的腺嘌呤,而不是通过作用于核糖体来调控自身水平的表达。

不同的RIPs作用的底物可能不一样,对同一底物表现出的活性也可能不同,这可能与RIPs本身蛋白质结构及RIPs识别的底物结构相关,具体的分子机制有待深入研究。

1.3 RIPs的RNase和DNase酶活性 关于RIPs的核酸酶活性尚未得出确定的结论。Li等^[20]发现TCS能切割超螺旋和环状DNA(pBluescriptII、SV40等)形成线形的DNA,因此他们认为TCS具有DNA酶活性;Ling等^[21]发现,蓖麻毒蛋白、丝瓜毒蛋白(luffin)、辛纳毒蛋白(cinnamomin)和克木毒蛋白(camphorin),在低浓度下可将超螺旋DNA切割形成有缺口的DNA,在高浓度下能将超螺旋DNA切割形成线形DNA,而且蓖麻毒蛋白A链在煮沸后仍然保持切割超螺旋DNA的能力,表现出DNA酶活性。但Day等^[22]的实验显示,蓖麻毒蛋白和PAP并没DNase活性,而且从大肠杆菌纯化的重组蛋白蓖麻毒蛋白和PAP都未发现有DNase活性,因此认为一些RIPs的DNase活性是由于核酸酶污染造成。Barbieri等^[23]发现来源于4个不同家族的4种RIPs[多花白树毒蛋白(gelonin)、苦瓜毒蛋白I(momordin I)、PAP和肥皂草毒蛋白S6(saporins-S6)]除了PAG活性外,并未表现出解超螺旋DNA等DNase活性。在研究RNase活性中,Mock等^[24]发现苦瓜毒蛋白II(momordin II)具有多聚U特异的RNase活性,但Valbonesi等^[25]得到的高纯度苦瓜毒蛋白II,表现PAG活性,但没有RNase活性。

近年来,关于RIPs的核酸酶活性再次得到Ng

等^[26]、Wang 和 Tumer^[27]及 He 和 Liu 等^[28]的确认, 但 RIPs 是否有核酸酶活性还有待进一步确定。关于 RIPs 核酸酶活性的争议, 可能是实验技术条件不同带来差异; 另外, 有些 RIPs 可能确实有 RNase 或 DNase 活性, 但不能由此推论其它 RIPs 也具有 RNase 或 DNase 活性。得到高纯度的无酶污染的 RIPs, 则是研究 RIPs 是否具有核酸酶活性及其它酶活性的前提。

1.4 RIPs的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性 Sharma等^[29]从烟草(*Nicotiana tabacum*)叶子中分离纯化出一种核糖体失活蛋白(tobacco RIP, TRIP), 其分子量为26 kD。TRIP 内部含有一个15个氨基酸肽序列, 与从野生烟草(*Nicotiana plumbaginifolia*)、拟南芥、马铃薯(*Solanum tuberosum*)分离到的Fe-SOD内部一段氨基酸序列同源。纯化的TRIP除了具有RIPs一般酶活性外, 还具有SOD活性, 说明TRIP具有RIPs和Fe-SOD双酶活性特征。这与Li等^[30]报道的克木毒蛋白具有SOD和RIPs双酶活性的结果一致。Sharma等^[29]认为, TRIP根据于体内的需要, 在环境胁迫(如金属离子和代谢产物等)条件下表现为SOD酶活性, 而在其它情况(如病原侵入等)下表现为RIPs活性, 推测TRIP可能参与了烟草体内多种防御生理功能。

2 植物中RIPs的抗病毒机制

RIPs的酶学机理预示其抗病毒活性。自从PAP被确证为抗病毒的RIP以来, 人们相继发现RIPs具有广谱的抗各种动植物RNA和DNA病毒的活性^[3]。TCS^[31]等10种RIPs在体外都有抑制HIV-1病毒复制的功能, 目前TCS治疗艾滋病的研究已进入临床III期。RIPs对病毒的抗性可能是植物的一种防御策略^[8]。Lodge等^[32]将PAP基因转入烟草, 使转基因植物获得了抗多种病毒的性状。Moon等^[33]将编码核糖体失活蛋白PIP(*Phytolacca insularis* antiviral protein)的cDNA转化马铃薯后, 转基因植物可抗马铃薯X病毒、马铃薯Y病毒和马铃薯卷叶病毒。但植物如何通过体内积累毒蛋白, 调控RIPs的酶活性以防御病毒等病原的侵入, 并且不造成自身毒害的机理仍不清楚。目前认为RIPs在植物中抗病毒机制主要有以下两种方式:

(1) RNA N-糖苷酶或PAG酶活性赋予RIPs使核糖体失活的活性(ribosome inactivating activity, RI), 抑制细胞核糖体对蛋白质的合成, 导致细胞死亡, 抑制病毒在细胞内的复制和增殖。最有代表性的是Ready等^[34]的局部自杀(local suicide)学说。他们用免疫电镜方法观察到PAP主要定位在细胞膜与细胞壁之间, RIPs在内质网以前体的形式合成, 其N端有一段信号肽序列, 运输到胞质外形成区隔化后, 经过切割和折叠形成成熟的RIPs; 当细胞遭受病毒感染或其它机械损害时, 细胞膜完整性受到破坏, RIPs即进入受感染的细胞质中, 引起核糖体失活从而阻断细胞蛋白质翻译, 导致细胞死亡, 于是病毒不能在细胞内复制和继续感染邻近的细胞。

随着转基因植物和基因突变的研究, 人们对RIPs的RI赋予植物抗病毒的机制有了更深刻的理解。Lodge等^[32]将PAP的cDNA导入烟草和马铃薯植物, 转基因植物表现广谱的抗病毒活性, 但是高水平的PAP表达会影响转基因植物的正常生长, 如叶子带有杂斑, 植株个体矮小等。Hur等^[35]在酵母中筛选出两种PAP的突变体HMNT123-2和HMNT124-3, 其中, HMNT123-2是在PAP酶活性位点进行一个点突变(E176V), 而HMNT124-3突变掉C端25个氨基酸。Tumer等^[36]将HMNT123-2和HMNT124-3分别转入烟草中并得到表达, 在这两个PAP的突变体转基因烟草中都没有检测到脱腺嘌呤作用, 因此不会对转基因植物产生毒性, 但HMNT124-3 PAP转基因植株在表达量低的情况下却表现出对PVX等病毒的高抗性, 而HMNT123-2 PAP转基因植株没有表现对病毒的抗性, 这一结果在体外实验中也得到了证实, 而野生型和其它突变体在体外和体内实验中都表现出酶活性和毒性。从而证明PAP完整的酶活性位点对维持PAP在体内、体外的所有酶活性是必要的, 以核糖体失活活性不足以解释PAP的抗病毒的特性。因为HMNT124-3突变体在体外实验中表现出RI, 但在转基因烟草中并未表现出RI, 却成功赋予了抗病毒抗性, 说明PAP赋予植物抗病毒的特性与PAP的RI并没有直接关系。

RIPs抗动物病毒中也有相似的研究结果。过去人们认为TCS的抗HIV-1活性, 是因为它的RI,

但Wang等^[37]的研究发现,有两个保留了RI的TCS突变体(*TCSM_{C19aa}*、*TCS_{KDEL}*)在体外均失去了抗HIV-1活性,也再次证实用RI已不足以解释RIPs的抗病毒机制。

(2) RIPs的PAG活性直接作用于病毒的核酸分子,从多位点释放腺嘌呤以抑制病毒复制。RIPs能在体外攻击病毒核酸分子。MAP(*Mirabilis antiviral protein*)^[38]是一种I型RIPs,它不仅能脱去rRNA上的腺嘌呤抑制蛋白质合成,而且能脱去DNA、多聚核苷酸、TMV基因组RNA等的腺嘌呤,破坏核酸分子。Hudak等^[39]发现PAP及其几种突变体,虽然都不能作用于核糖体,但能够抑制雀麦草花叶病毒(BMV)和马铃薯X病毒RNA的翻译,而且它还能专一性地识别带m7GpppG的加帽mRNA并从上其释放腺嘌呤,抑制蛋白质的合成,但它对无帽或带GpppG或GTP的mRNA没有作用。这表明PAP除了以RNA N-糖苷酶活性抑制蛋白质的合成的机制外,而且还能专一识别m7GpppG-mRNA并释放其嘌呤碱基抑制蛋白质合成的机制。Rajamohan等^[17]和Park等^[40]的研究也证实,RIPs可能是直接作用于病毒的核酸分子,破坏病毒核酸分子而抑制病毒的。最近,Vandenbussche等^[41]利用接骨木RIPs基因转移导入烟草,研究植物体内RIPs抗病毒活性,认为一些RIPs可能直接作用于病毒核酸分子而具有抗病毒特性。

当病毒突破细胞壁,RIPs可以直接破坏核酸分子而抗病毒,但是RIPs并不直接作用于病毒颗粒,只有当病毒颗粒解折叠并暴露它的核酸分子时,RIPs才能显示它的酶活性,破坏病毒核酸分子。因此,植物如何调控和起始RIPs酶活性的机制以及RIPs与病毒核酸分子的相互识别作用的分子机制,仍然是目前需要搞清楚的两个主要问题。

3 结束语

RIPs独特的生理功能受到人们的广泛关注。RIPs是植物防御体系的一部分,对RIPs功能机制的研究不仅有助于我们了解RIPs在植物防御中扮演的角色,而且将来还可以很好地将RIPs应用于农业、医学等领域。近年来,对RIPs的毒性和生物酶功能的研究虽然有了一定的进展,但对

RIPs的抗病毒机制还不十分清楚。Hudak等^[42]认为,PAP的核糖体脱嘌呤作用不足以解释PAP对细胞造成的毒性。另外,PAP赋予植物抗病毒的特性与PAP的RI并没有直接关系,这些都暗示RIPs可能存在另外的对细胞造成毒性和赋予植物抗病毒特性的机制,这一机制尚需研究。总之,随着PAP等一些RIPs基因克隆、蛋白纯化和蛋白三维结构研究的深入,基因突变、转基因、基因沉默等生物技术的应用,RIPs作用机制的研究将会有所深入。

参考文献

- 1 Barbieri L, Battelli MG, Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1154: 237~282
- 2 Steeves RM, Denton ME, Barnard FC et al. Identification of three oligosaccharide binding sites in ricin. *Biochemistry*, 1999, 38: 11677~11685
- 3 Wang P, Tumer NE. Virus resistance mediated by ribosome inactivating proteins. *Adv Virus Res*, 2000, 55: 325~355
- 4 Sandvig K, van Deurs B. Entry of ricin and shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives. *EMBO J*, 2000, 19: 5943~5950
- 5 Yeung HW, Li WW, Feng Z et al. Trichosanthin, alpha-momorcharin and beta-momorcharin: identity of abortifacient and ribosome-inactivating proteins. *Int J Pept Protein Res*, 1988, 31: 265~268
- 6 Zarling JM, Moran PA, Haffar O et al. Inhibition of HIV replication by pokeweed antiviral protein targeted to CD4⁺ cells by monoclonal antibodies. *Nature (London)*, 1990, 347: 92~95
- 7 Lin JY, Tserng KY, Chen CC et al. Abrin and ricin: new anti-tumour substances. *Nature (London)*, 1970, 227: 292~293
- 8 Dai WD, Bonos S, Guo Z. Expression of pokeweed antiviral proteins in creeping bentgrass. *Plant Cell Rep*, 2003, 21: 497~502
- 9 Montanaro L, Sperti S, Mattioli A et al. Inhibition by ricin of protein synthesis *in vitro*. Inhibition of the binding of elongation factor 2 and of adenosine diphosphate-ribosylated elongation factor 2 to ribosomes. *Biochem J*, 1975, 146(1): 127~131
- 10 Pestova TV, Lomakin IB, Lee JH et al. The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature*, 2000, 403(6767): 332~335
- 11 Endo Y, Tsurugi K. RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. *J Biol Chem*, 1987, 262(17): 8128~8130
- 12 Endo Y, Mitsui K, Motizuki M et al. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28S ribosomal RNA caused by the toxins. *J Biol Chem*, 1987, 262(12): 5908~5912

- 13 Zhang JS, Liu WY. The mechanism of action of trichosanthin on eukaryotic ribosomes—RNA *N*-glycosidase activity of the cytotoxin. *Nucl Acid Res*, 1992, 20(6): 1271~1275
- 14 Barbieri L, Valbonesi P, Bonora E et al. Polynucleotide: adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly(A). *Nucl Acid Res*, 1997, 25: 518~522
- 15 Barbieri L, Ferreras JM, Barraco A et al. Some ribosome-inactivating proteins depurinate ribosomal RNA at multiple sites. *Biochem J*, 1992, 286: 1~4
- 16 Barbieri L, Valbonesi P, Govoni M et al. Polynucleotide: adenosine glycosidase activity of saporin-L1: effect on various forms of mammalian DNA. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1480(1, 2): 258~266
- 17 Rajamohan F, Venkatachalam TK, Irvin JD et al. Pokeweed antiviral protein isoforms PAP-I, PAP-II, and PAP-III depurinate RNA of human immunodeficiency virus (HIV)-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 260: 453~458
- 18 Parikh BA, Coetzer C, Tumer NE. Pokeweed antiviral protein regulates the stability of its own mRNA by a mechanism that requires depurination but can be separated from depurination of the α -sarcin/ricin loop of rRNA. *J Biol Chem*, 2002, 277: 41428~41437
- 19 Vepachedu R, Bais HP, Vivanco JM. Molecular characterization and post-transcriptional regulation of ME1, a type-I ribosome-inactivating protein from *Mirabilis expansa*. *Planta*, 2003, 217: 498~506
- 20 Li MX, Yeung HW, Pan LP et al. Trichosanthin, a potent HIV-1 inhibitor, can cleave supercoiled DNA *in vitro*. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19: 6309~6312
- 21 Ling J, Liu WY, Wang TP. Cleavage of supercoiled double-stranded DNA by several ribosome-inactivating proteins *in vitro*. *FEBS Lett*, 1994, 345: 143~146
- 22 Day PJ, Lord JM, Roberts LM. The deoxyribonuclease activity attributed to ribosome-inactivating proteins is due to contamination. *Eur J Biochem*, 1998, 258: 540~545
- 23 Barbieri L, Valbonesi P, Righi F et al. Polynucleotide: adenosine glycosidase is the sole activity of ribosome-inactivating proteins on DNA. *J Biochem*, 2000, 128: 883~889
- 24 Mock J, Ng W, Wong TB et al. Demonstration of ribonuclease activity in the plant ribosome-inactivating proteins alpha- and beta-momorcharins. *Life Sci*, 1996, 59: 1853~1859
- 25 Valbonesi P, Barbieri L, Bolognesi A et al. Preparation of highly purified momordin II without ribonuclease activity. *Life Sci*, 1999, 65: 1485~1491
- 26 Ng TB, Lam YW, Wang H. Calcaelin, a new protein with translation-inhibiting, antiproliferative and antimutagenic activities from mosaic puffball mushroom *Calvatia caelata*. *Planta Med*, 2003, 69: 212~217
- 27 Wang P, Tumer NE. Pokeweed antiviral protein cleaves double-stranded supercoiled DNA using the same active site required to depurinate rRNA. *Nucl Acid Res*, 1999, 27: 1900~1905
- 28 He WJ, Liu WY. Both N- and C-terminal regions are essential for cinnamomin A-chain to deadenylate ribosomal RNA and supercoiled double-stranded DNA. *Biochem J*, 2004, 377: 17~23
- 29 Sharma N, Park SW, Vepachedu R et al. Isolation and characterization of an RIP-like protein from *Nicotiana tabacum* with dual enzymatic activity. *Plant Physiol*, 2004, 134: 171~181
- 30 Li XD, Chen WF, Liu WY et al. Large-scale preparation of two new ribosome-inactivating proteins, cinnamomin and camphorin, from the seeds of *Cinnamomum camphora*. *Protein Expr Purificat*, 1997, 10: 27~31
- 31 McGrath MS, Hwang KM, Caldwell SE et al. GLQ223: an inhibitor of human immunodeficiency virus replication in acutely and chronically infected cells of lymphocyte and mononuclear phagocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 2844~2848
- 32 Lodge JK, Kaniewski WK, Tumer NE. Broad-spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 7089~7093
- 33 Moon YH, Song SK, Choi KW et al. Expression of a cDNA encoding *Phytolacca insularis* antiviral protein confers virus resistance on transgenic potato plants. *Mol Cell*, 1997, 7: 807~815
- 34 Ready MP, Brown DT, Robertus JD. Extracellular localization of pokeweed protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 84: 5053~5056
- 35 Hur Y, Hwang DJ, Zoubenko O et al. Isolation and characterization of pokeweed antiviral protein mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of residues important for toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(18): 8448~8452
- 36 Tumer NE, Hwang DJ, Bonness M. C-terminal deletion mutant of pokeweed antiviral protein inhibits viral infection but does not depurinate host ribosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(8): 3866~3871
- 37 Wang JH, Nie HL, Huang H et al. Independency of anti-HIV-1 activity from ribosome-inactivating activity of trichosanthin. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 302: 89~94
- 38 Bolognesi A, Polito L, Lubelli C et al. Ribosome-inactivating and adenine polynucleotide glycosylase activities in *Mirabilis jalapa* L tissues. *J Biol Chem*, 2002, 277(16): 13709~13716
- 39 Hudak KA, Wang P, Tumer NE. A novel mechanism for inhibition of translation by pokeweed antiviral protein: depurination of the capped RNA template. *RNA*, 2000, 6: 369~380
- 40 Park SW, Vepachedu R, Owens RA et al. The *N*-glycosidase activity of ribosome-inactivating protein ME1 targets single-stranded regions of nucleic acids independent of sequence or structural motifs. *J Biol Chem*, 2004, 279: 34165~34174
- 41 Vandenbussche F, Desmyter S, Ciani M et al. Analysis of the *in planta* antiviral activity of elderberry ribosome-inactivating proteins. *Eur J Biochem*, 2004, 271(8): 1508~1515
- 42 Hudak KA, Parikh BA, Di R et al. Generation of pokeweed antiviral protein mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence that ribosome depurination is not sufficient for cytotoxicity. *Nucl Acid Res*, 2004, 32(14): 4244~4256