

核糖体失活蛋白—RNA N-糖苷酶

董 焯* 刘望夷

(中国科学院上海生物化学研究所)

核糖体失活蛋白 (Ribosome-Inactivating-Protein, RIP) 是一类作用于真核细胞核糖体, 抑制蛋白质合成的蛋白毒素^[1]。迄今, 除了在

少数几种真菌中发现外^[2,3], 人们已从 50 多种植物中分离出 60 多种不同的 RIP 或具有 RIP 活性的粗提物。有迹象表明, RIP 可能广

表 1 含核糖体失活蛋白(RIP)的植物种类与部位

植物种类	含 RIP 部位	拉丁文名称	植物种类	含 RIP 部位	拉丁文名称
老枪谷	种子	<i>Amaranthus caudatus rubens</i>	母菊	种子	<i>Matricaria camomilla</i>
龙舌兰*	叶	<i>Agave americana</i>	卷心菜*	叶	<i>Brassica capitata</i>
洋常春藤*	叶	<i>Hedera helix</i>	无花果叶瓜	种子	<i>Cucurbita ficifolia</i>
麦仙翁*	种子	<i>Agrostemma githago</i>	芭豆*	种子	<i>Croton tiglium</i>
香石竹	种子	<i>Dianthus caryophyllus</i>	三叶胶树*	种子	<i>Hevea brasiliensis</i>
肥皂草*	种子	<i>Saponaria officinalis</i>	麻疯树*	种子	<i>Jatropha curcas</i>
丝瓜*	种子	<i>Luffa cylindrica</i>	木薯*	叶	<i>Manibot utilissima</i>
雪白麦瓶草	种子	<i>Silene alba</i>	马蹄纹天竺葵	叶	<i>Pelargonium zonale</i>
甜菜*	叶	<i>Beta vulgaris</i>	谷子*	种子	<i>Setaria italica</i>
藜*	种子	<i>Chenopodium album</i>	薰衣草*	叶	<i>Lavandula angustifolia</i>
苋色藜	叶	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	撒尔维亚	叶	<i>Salvia officinalis</i>
菠菜*	叶	<i>Spinacia oleracea</i>	意大利伞松	胚乳	<i>Pinus pinea</i>
金凤花*	种子	<i>Caesalpinia pulcherrima</i>	绵马	叶	<i>Dryopteris filix</i>
鹰嘴豆	种子	<i>Cicer arietinum</i>	草薺*	叶	<i>Fragaria ananassa</i>
洋槐*	种子	<i>Robinia pseudoacacia</i>	黑麦*	种子	<i>Secale cereale</i>
蚕豆*	种子	<i>Vicia faba</i>	蓖麻*	种子	<i>Ricinus communis</i>
洋葱*	苞片	<i>Allium cepa</i>	旱芹*	茎和叶	<i>Apium graveolens</i>
小麦*	种子胚	<i>Triticum aestivum</i>	野胡萝卜*	根	<i>Daucus carota</i>
石刁柏*	种子	<i>Asparagus officinalis</i>	大麦*	种子	<i>Hordeum vulgare</i>
铃兰*	叶	<i>Convallaria majalis</i>	玉米*	种子	<i>Zea mays</i>
假叶树*	根	<i>Ruscus aculeatus</i>	相思子*	种子	<i>Abrus precatorius</i>
槲寄生*	叶	<i>Viscum album</i>	苦瓜*	种子	<i>Momordica charantia</i>
绿藜芦	叶和根	<i>Veratrum viridis</i>	美洲商陆	叶和种	<i>Phytolacca americana</i>
无花果*	胶乳	<i>Ficus carica</i>	白屈菜	种子	<i>Chelidonium matus</i>
栝楼*	根和种子	<i>Trichosanthes kirilowii</i>		根	<i>Adenia valkensisii</i>
	种子	<i>Gelonium mutiform</i>		叶	<i>Phytolacca dodecandra</i>
	胶乳	<i>Hura creptans</i>		根	<i>Adenia digitata</i>
异株泻根	叶	<i>Bryonia dioica</i>		种子	<i>Asparagus aculeatus</i>
	叶	<i>Lychnis vulgaris</i>		叶	<i>Agrostemma githago</i>
	叶	<i>Lactuca vulgaris</i>	樟树*	种子	<i>Cinnamomum camphora</i>

* 中国可以找到的植物。

* 河南大学生物系进修教师。

泛存在于植物界^[3,4]。据现有资料,将含有RIP的植物列成表格(表1)。在我国可以找到30多种,其中天花粉毒蛋白是从栝楼块根抽提出的一种蛋白质,在临床上可用于中期妊娠流产,为我国中草药天花粉的重要成分。本文对核糖体失活蛋白的一般性质、作用机理和生理功能作一简单介绍。

一、RIP的一般性质

现已纯化的RIP有两种类型,即单链RIP和双链RIP,分别称为类型I和类型II。单链RIP只有一条肽链(表2),如苦瓜毒素等。它们的分子量较小,均在3万左右,且为强碱性蛋白质($pI \geq 9.5$),其中多数为糖蛋白。双链

RIP由A、B两条肽链组成(表3),如蓖麻毒素等。A链较小,其等电点比较偏向酸性,可以使核糖体失活。B链较大,没有使核糖体失活的活性。A和B两条肽链之间由一个二硫键连接。另外,还有一些RIP有4条肽链,实际上它们是两个相同的双链RIP通过次级键结合在一起的二聚体。其性质与双链RIP相同。

目前,人们主要以哺乳动物的细胞体系来研究RIP的毒性和作用机理。实验结果表明,RIP多数作用于核糖体的60S亚基,抑制依赖于延伸因子1(EF1)的氨酰tRNA与核糖体的结合和依赖于延伸因子2(EF2)的氨酰tRNA的移位,从而抑制蛋白质的生物合

表2 单链RIP

来源	RIP名称	产量 (mg/100g)	分子量	含糖量 (%)	抑制蛋白质合成		对大鼠的毒性 (LD ₅₀) ^d (mg/kg)
					无细胞制剂 ^a (ID ₅₀) ^c (nM) ^e	完整细胞 ^b (ID ₅₀) (nM)	
麦仙翁	麦仙翁毒素2 (agrostin 2)	8.4	30600	6.68	0.6		1
	麦仙翁毒素5 (agrostin 5)	34.2	29500	6.87	0.47	9200	1
	麦仙翁毒素6 (agrostin 6)	18.4	29500	7.17	0.57	7800	1
香石竹	香石竹毒素30 (dianthin 30)	2	29500	1.56	0.3	18000	
	香石竹毒素32 (dianthin 32)	2	31700	2.34	0.12	14000	30
肥皂草	肥皂草毒素5 (saporin 5)	63	29500		0.041		
	肥皂草毒素6 (saporin 6)	414	29500	无	0.037	2300	4.0
	肥皂草毒素9 (saporin 9)	115	29500	无	0.037	5400	1.7
丝瓜	丝瓜毒素 (luffin)	51	26000		0.002		
苦瓜	苦瓜毒素 (momordin)	150—180	31000	1.74	0.06	32000	4.3
<i>Gelonium multiflorum</i>	gelonin	250—300	30000	2.34	0.4	34000	40

(续表2)

来源	RIP 名称	产量 (mg/100 g)	分子量	含糖量 (%)	抑制蛋白质合成		对大鼠 的毒性 (LD ₅₀) ^d (mg/kg)
					无细胞制剂 ^a (ID ₅₀) ^c (nM) ^e	完整细胞 ^b (ID ₅₀) (nM)	
大麦	大麦毒素	3—4	31000	无	0.83		
黑麦	黑麦毒素	200	30000		4.0		
小麦	小麦毒素 (tritin)	3	30000		2.3		
玉米	玉米毒素	35	23000		2.13		
石刁柏	峰 2	24	32500	1.42	0.43	3100	
	峰 3	8	32500	1.2	0.37	3100	
	峰 5	18	32500	1.32	0.17	3100	
美洲商陆(叶子)	美洲商陆毒素 (PAP) ^f	9.2	29000	无	0.24		
(夏季叶子)	美洲商陆毒素 II (PAP II)	3.6	30000	无	0.25		
(种子)	美洲商陆毒素 S (PAP s) ^g	100—180	31000	无	0.037	33000	2.6
Phytolacca dodecandra	dodecandrin	3.4	29000		0.043		
栝楼(根)	天花粉毒蛋白 (Trichosanthin) ^h		25000	无			

- 注: a. 以兔网织红细胞无细胞制剂为试验材料。
 b. 以赫拉(Hela)细胞为试验材料。
 c. 达到 50%抑制作用所需之浓度。
 d. 半致死量。
 e. 毫微摩尔浓度。
 f. PAP 为 pokeweed antiviral protein 的缩写。
 g. 由美洲商陆种子中抽取的 PAP。
 h. 从栝楼种子中抽提的毒蛋白称 Trichokirin。

成^[5-8]。更重要的是,就现在已知的 RIP 来说,使核糖体失活只需很少量的 RIP,即只需要催化量的 RIP 就可以有效地抑制哺乳动物细胞的蛋白质合成,并且不需要其他辅助因子。由此,人们推测 RIP 可能属于水解酶类^[9]。

当单链 RIP 或双链 RIP 作用于哺乳动物细胞时,对于无细胞体系(Reticulocyte lysate),单链 RIP 活性较高, ID₅₀ 大都在 1 nM 以下,而双链 RIP 活性则相对较低, ID₅₀ 大都为数十 nM。对于完整的细胞体系,单链 RIP 就显得无能为力,活性很低,其 ID₅₀ 值常高达数

千甚至上万 nM,而双链 RIP 则显出很高的活力, ID₅₀ 值大都低于 10⁻² nM 的水平(表 2 和 3)。其原因在于两者的结构不同。前面说过,双链 RIP 含有 A、B 两条肽链。其中 A 链可抑制蛋白质的合成,而 B 链则与细胞膜表面上的某些糖基结合,并将 A 链导入细胞内部。单独的 A 链或单链 RIP 进入细胞均比较困难。在无细胞体系中,双链 RIP 的活性低是由于 B 链的存在降低了 A 链的活力。面对完整的细胞, A 链或单链 RIP 则很难跨越细胞膜进入细胞内部。若将单链 RIP 与双链 RIP 的 B 链

表3 双链RIP

来源	RIP名称	产量 (mg/100g)	分子量	含糖量 (%)	抑制蛋白质合成		对大鼠 的毒性 (LD ₅₀) (μg/kg)
					无细胞制剂 ^a (ID ₅₀) (nM)	完整细胞 ^b (ID ₅₀) (nM)	
蓖麻	蓖麻毒素 (ricin)	120	62057	4.5	84	0.0011	2.6
	A链		30625	2.6	0.1		
	B链		31432	6.4			
相思子	相思子毒素 (abrin)	75	65000	7.4	88	0.0037	0.56
	A链		30000	无	0.5		
	B链		36000	7.4			
槲寄生	槲寄生毒素 (viscumin)	6.8	60000	9.7	43.3	0.008	2.4
	A链		29000		3.5		
	B链		32000				
<i>Adenia digitata</i>	modeccin	20-180	63000	2.66	45	0.0003	2.3
	A链		28000		2.3		
	B链		31000				
<i>Adenia volkensii</i>	volkensin	37.5	62000	5.74	84	0.0123	1.4
	A链		29000		0.37		
	B链		36000				

a. 以兔网织红细胞无细胞制剂为试验材料。

b. 以赫拉(Hela)细胞为试验材料。

交叉重组, 或与特定的载体结合, 可以提高单链RIP对完整细胞的毒性上万倍。例如, 将苦瓜毒素结合在红细胞空壳上, 其对完整细胞的ID₅₀值从32000 nm 骤降到0.03 nm^[9]。

二、RIP的作用机理

关于RIP使核糖体失活机理的研究已有不少报告。近年来, 已有20多种RIP的作用机理被阐明了(表4)。RIP的作用机理有两种类型: (1) RNA水解酶型。从帚曲霉菌中分离出的帚曲菌素(α-Sarcin)表现出RNA水解酶的活性。它水解rRNA的磷酸二酯键。在EDTA存在下, 它能专一地从小鼠肝核糖体的28S rRNA的3'端切下一个长为488个核苷酸的

片段(称α-片段)^[2], 从而使核糖体失活, 抑制蛋白质的合成。(2) RNA N-糖苷酶(RNA N-glycosidase)型。它们专一水解真核细胞核糖体28S rRNA的第4324位腺苷酸的腺嘌呤碱基与核糖之间的N-C糖苷键, 释放一个腺嘌呤碱基, 使核糖体失活^[11]。α-Sarcin和RNA N-糖苷酶都作用于28S rRNA, 其位点也很接近(见图1), 距离仅一个核苷酸之差。从RNA N-糖苷酶水解过的核糖体中提取出的28S rRNA, 在苯胺催化下水解可以得到一个长为489个核苷酸的片段^[12-14]。从栝楼种子中抽提的一个毒蛋白(称Trichokirin), 其作用机理属于RNA N-糖苷酶型。从栝楼块根中抽提的一个毒蛋白, 即天花粉蛋白(Trichosa-

其中的一部分。从组成上来分, IT 可以分为 3 类。第一类是双链 RIP 的 IT, 例如由蓖麻毒素形成的 IT。这类 IT 的毒性很高, 但专一性较差。这主要是由于 B 链的非专一性结合所致^[10]。第二类是 A 链的 IT。尽管这类 IT 的专一性很高, 但对靶细胞的毒性还不能令人满意。最后一类为单链 RIP 的 IT。与制备 A 链相比, 制备单链 RIP 比较容易, 也比较安全。另外, 单链 RIP 的种类也很多。因此, 科学家们对研究单链 RIP 的 IT 更加重视。

由于有许多问题有待解决, 近期内还无法将 IT 用于临床实践。其中最重要的障碍是免疫毒素的专一性、它在生物体内的存留期和对靶细胞的毒性等。如上所述, 双链 RIP 的 IT 具有明显的非专一性结合。这样就失去了免疫毒素的意义。因此, 必须彻底消除 IT 的非专一性结合。目前, 一些研究人员正试图通过对 B 链的化学修饰以消除对细胞表面半乳糖的结合, 进而解决这个问题^[10]。再者, IT 在体内的存留期也有待研究。动物实验表明, 在还没有到达靶细胞以前, 大量的 IT 已被网状内皮系统细胞“吃掉”。这是因为大多数 RIP 是糖蛋白所引起的^[20]。另外, IT 对靶细胞的毒性也必须进一步提高, 尤其是 A 链 IT 和单链 RIP 的 IT。如能先弄清楚双链 RIP 的 A 链进入细胞的机制, 将有利于这个问题的解决。据现有的资料看, 在体外实验中还没有发现何种 IT 能将靶细胞 100% 地杀死。在临床实践中, 只要残留一个活的癌细胞, 癌症就可能死灰复燃。

最后要指出的是, 关于 RIP 的研究仅刚刚开始, 无论在理论方面还是在应用方面还有很多问题有待进一步地研究和开发。

摘 要

本文概述了双链和单链植物核糖体失活蛋

白的基本特性, 在分子水平上讨论了核糖体失活蛋白作用于真核细胞核糖体的机制。扼要介绍了免疫毒素及其在癌症治疗中的应用。同时, 也讨论了目前有关核糖体失活蛋白的研究状况和今后的发展趋向。

参 考 文 献

- [1] Stirpe, F. et al. 1980, *Biochem. J.* 190: 843.
- [2] Endo, Y. and Wool, I. G. 1982, *J. Biol. Chem.* 257:9054.
- [3] Jimenez, A. and Vazquez, D. 1985, *Ann. Rev. Microbiol.* 39:649.
- [4] Gasperi-Campani, A. et al. 1985, *J. Nat. Prod.* 48:446.
- [5] Benson, S. et al. 1975, *Eur. J. Biochem.* 59:573.
- [6] Gasperi-Campani, A. et al. 1978, *Biochem. J.* 174:491.
- [7] Gessner, S. L. and Irvin, J. D. 1980, *J. Biol. Chem.* 255:3251.
- [8] Montanaro, L. et al. 1973, *Biochem. J.* 136: 677.
- [9] Stirpe, F. and Barber, L. 1986, *FEBS Lett.* 195:1.
- [10] Vitetta, E. S. and Uhr, J. W. 1985, *Ann. Rev. Immunol.* 3:197.
- [11] Endo, Y. and Tsurugi, k. 1987, *J. Biol. Chem.* 262:8128.
- [12] Olsnes, S. 1987, *Nature* 328:474.
- [13] Endo, Y. et al. 1987, *J. Biol. Chem.* 262: 5908.
- [14] Stirpe, F. et al. 1988, *Nucleic Acids Res.* 16:1349.
- [15] Battelli, M. G. et al. 1984, *J. Exp. Bot.* 155:882.
- [16] Owens, R. A. et al. 1973, *Virology* 56: 390.
- [17] Filipovich, A. H. et al. 1984, *Lancet* 1: 469.
- [18] Stirpe, F. 1982 *Biochem. J.* 202:279.
- [19] Vallera, D. A. et al. 1982, *J. Exp. Med.* 155:949.
- [20] Stahl, P. D. et al. 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1399.