

- Drug Dispos*, 2001, 22(1): 23-29.
- [8] Walgren R A, Karnaky K J, Lindenmayer G E, et al. Efflux of dietary flavonoid quercetin 4'- β -glucoside across human intestinal Caco-2 cell monolayers by apical multidrug resistance-associated protein 2 [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 294(3): 830-836.
- [9] Xie H T, Wang G J, Zhao X C, et al. Study on uptake and metabolism of ginsenoside Rg3 [J]. *Chin J Pharmacol Ther* (中国临床药理学与治疗学), 2004, 9(3): 257-260.
- [10] Konishi Y, Shimizu M. Trans epithelial transport of ferulic acid by monocarboxylic acid transporter in Caco-2 cell monolayers [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, 67(4): 856-862.
- [11] Zhang L, Zheng Y, Chow M S, et al. Investigation of intestinal absorption and disposition of green tea catechins by Caco 2 monolayer model [J]. *Int J Pharm*, 2004, 287(1-2): 1-12.
- [12] Hidalgo I J, Raub T J, Borchardt R T. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability [J]. *Gastroenterology*, 1989, 96(3): 736.
- [13] Rubas W, Mlomwell M E, Shahrokh Z, et al. Flux measurements across Caco-2 monolayers may predict transport in human large intestinal tissue [J]. *J Pharm Sci*, 1996, 85: 165.
- [14] Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 175(3): 880-885.
- [15] Yee S. *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man-lact or myth [J]. *Pharm Res*, 1997, 14(6): 763.
- [16] Lennernas H, Palm K, Fagerholm U, et al. Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells *in vitro* and human jejunum *in vivo* [J]. *Int J Pharm*, 1996, 127(1): 103-107.
- [17] Lennernas H, Nilsson D. The effect of L-leucine on the absorption of levodopa studied by regional jejunal perfusion in man [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1995, 35: 243-250.
- [18] Sim J S, Zhao H L, Li D W, et al. Effects of saponins from the root bark of *Aralia elata* on the transport of chondroitin sulfate in Caco-2 cell monolayers and rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(6): 1043-1048.
- [19] Rouquayrol M, Gaucher B, Roche D, et al. Trans epithelial transport of prodrugs of the HIV protease inhibitors saquinavir, indinavir, and nelfinavir across Caco-2 cell monolayers [J]. *Pharm Res*, 2002, 19(11): 1704-1712.
- [20] Yamashita S, Furubayashi T, Kataoka M, et al. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2000, 10(3): 195-204.
- [21] Jezyk N, Li C, Stewart B H, et al. Transport of pregabalin in rat intestine and Caco 2 monolayers [J]. *Pharm Res*, 1999, 16(4): 519.
- [22] Gan L S L, Thakker D R. Applications of the Caco-2 model in the design and development of orally active drugs: elucidation of biochemical and physical barriers posed by the intestinal epithelium [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1997, 23(1-3): 77-98.
- [23] Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 46: 27-43.
- [24] Konishi Y, Kobayashi S. Trans epithelial transport of chlorogenic acid, caffeic acid, and their colonic metabolites in intestinal Caco-2 cell monolayers [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(9): 2518-2526.
- [25] Menon R M, Barr W H. Transporters involved in apical and basolateral uptake of cefibuten into Caco 2 cells [J]. *Bio pharm Drug Dispos*, 2002, 23(8): 317-326.

槲寄生毒素研究进展

刘石磊, 杜秀宝, 范崇旭

(防化研究院第四研究所, 北京 102205)

摘要: 槲寄生毒素是药用植物槲寄生中非常重要的抗肿瘤成分之一, 是一类相对分子质量在 5 000 左右的含有 46 个氨基酸残基的碱性毒性多肽, 富含半胱氨酸。这类多肽对多种肿瘤细胞系具有细胞毒活性, 并具有免疫调节功效, 还有显著的降压、抗心律失常等作用。着重对槲寄生毒素的结构、功能、构效关系等方面的研究结果与进展进行综述。

关键词: 槲寄生; 槲寄生毒素; 多肽

中图分类号: R282.71

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)04-0619-04

Advances in research of viscotoxins in *Viscum colortum*

LIU Shi-lei, DU Xiu-bao, FAN Chong-xu

(Research Institute of Chemical Defense of PLA, Beijing 102205, China)

Key words: *Viscum colortum* (Kom.) Nakai; viscotoxin; polypeptides

药用植物槲寄生 *Viscum colortum* (Komar) Nakai 是桑寄生科槲寄生属 (*Viscum* L.) 半寄生性常绿灌木或小灌木, 寄生于桑科、茶科、山毛茛科、芸香科、蔷薇科和豆科等植物上,

在世界范围分布有 100 余种。中国植物志记载槲寄生 2 组 12 种, 2005 年版《中国药典》收载槲寄生 *V. coloratum* 一种。我国使用槲寄生有记载的历史始于秦汉时期, 古代称桑上寄生,

收稿日期: 2005-10-28

作者简介: 刘石磊 (1972), 女, 北京人, 天然产物化学专业博士研究生, 主要进行药用植物槲寄生中多肽的提取纯化、结构鉴定与活性研究工作。 Tel: (010)66758256 E-mail: liushilei402@263.net

为《神农本草经》上品,有补肝肾、强筋骨、祛风湿、养血安胎和降血压等功能,民间还用于治疗肝癌、肺癌等多种癌症。在欧洲,槲寄生被誉为“神奇的药草”,长期以来用于各种疾病的治疗,其水提取物用于癌症的辅助治疗就有近百年的历史,尤其是对实体瘤疗效显著^[1,2],可以治疗乳腺癌、胃癌、肺癌、肝癌及结肠癌等常见肿瘤疾病。由于槲寄生长期药用,对人体十分安全,英国卫生部已同意将其水提取物制剂 Iscardo 作为癌症化疗药物的辅助剂直接用于临床。专家们预测槲寄生有望成为继紫杉醇之后又一种天然抗癌药物。槲寄生中的活性成分主要包括:凝集素、槲寄生毒素、生物碱、多糖、寡糖、脂质及黄酮等。其中槲寄生毒素是槲寄生中非常重要的抗肿瘤成分之一,它们是一类相对分子质量在 5 000 左右的含有 46 个氨基酸残基的碱性毒性多肽,富含半胱氨酸。这类多肽对多种肿瘤细胞系具有细胞毒活性^[3,4],并有免疫调节功能^[5,6],槲寄生毒素还具有显著的降压、抗心律失常等作用。本文对槲寄生毒素的结构、功能、构效关系等方面的研究结果与进展进行综述。

1 槲寄生毒素的一级结构与基本性质

表 1 槲寄生毒素及相关多肽的氨基酸序列

Table 1 Amino acid sequences of different viscotoxins and relative polypeptides

名称	氨基酸序列					平均相对分子质量
	1	10	20	30	40	
viscotoxin A1	KSCCPSTTGR	NIYNTCRLTG	SSRETCAKLS	GCKIISASTC	PSNYPK	4 883.59
viscotoxin A2	KSCCPNTTGR	NIYNTCRFGG	GSREVCASLS	GCKIISASTC	PSDYPK	4 828.47
viscotoxin A3	KSCCPNTTGR	NIYNACRLTG	APRPTCAKLS	GCKHSGSTC	PSDYPK	4 829.59
viscotoxin B	KSCCPNTTGR	NIYNTCRLGG	GSRERCASLS	GCKIISASTC	PSDYPK	4 851.51
viscotoxin 1-PS	KSCCPNTTGR	NIYNTCRFGG	GSREVCARIS	GCKIISASTC	PSDYPK	4 897.58
viscotoxin U-PS	KSCCPNTTGR	NIYNTCRFGG	GSRPVCASLS	GCKIISGTKC	DSNGNH	4 802.48
viscotoxin C1(B3)	KSCCPNTTGR	NIYNTCRFAG	GSRERCASLS	GCKIISASTC	PSDYPK	4 940.65
viscotoxin B2	KSCCKNTTGR	NIYNTCRFAG	GSRERCASLS	GCKIISASTC	PSDYPK	4 971.71
viscotoxin B4(B6)	KSCCPNTTGR	NIYNTCRFAG	ASRETCASLS	GCKIISASTC	PSDYPK	4 954.68
viscotoxin B5	KSCCPSTTGR	NIYNTCRFTG	SSRETCAKLS	GCKIISASTC	PSDYPK	4 918.59
viscotoxin B8	KSCCPSTTGR	NIYNACRFTG	SSRETCAKLS	GCKIISASTC	PSDYPK	4 888.57
viscotoxin B7	KSCCRNTTGR	NCYNTCRLPG	TPRPVCASLC	DCKHSGSKC	PADYPR	5 002.80
phoratoxin B	KSCCPNTTGR	NIYNTCRFGG	GSRPICAKLS	GCKIISGTKC	DSGWDH ^[11]	4 889.61
phoratoxin C	KSCCPNTTGR	NIYNTCRFGG	GSRPICAKLS	GCKIISGTKC	DSGWDH	4 875.62
phoratoxin D	KSCCPNTTGR	NIYNTCRFGG	GSRPICAKLS	GCKIISGTKC	D	4 307.03
phoratoxin E	KSCCPNTTGR	NIYNTCRFGG	GSRPVCASLS	GCKIISGTKC	DSGWDH	4 875.58
phoratoxin F	KSCCPNTTGR	NIYNTCRLAG	GSRPICAKLS	GCKIISGTKC	DSGWDH	4 869.62
ligatoxin A	KSCCPNTTGR	NIYNTCRLTG	TSRPICASLS	GCKIISGTKC	DSGWDH ^[12]	4 902.60

至今已从欧洲白果槲寄生 *V. album* L. 中分离并鉴定一级序列的槲寄生毒素有 6 种^[7,8]: viscotoxins A1、A2、A3、B、1-PS、U-PS; 从亚洲槲寄生 *V. album ssp. coloratum* Ohwi 中分离了一种: viscotoxin C^[13]; 本实验室从中国东北槲寄生 *V. coloratum* 中提取并鉴定了 6 种: viscotoxins B2^[10]、B3 (C1)、B4、B5、B6、B7、B8。已鉴定的槲寄生毒素都含有 46 个氨基酸残基,富含半胱氨酸,除了从中国槲寄生中鉴定的 B7 含有 4 对二硫键外,其他槲寄生毒素均含有 3 对二硫键。这类多肽富含碱性残基,每个多肽都含有 3~4 个 R 和 3~4 个 K,等电点为 7.4~9.2。它们的氨基酸序列见表 1。由于寄主或采收季节的不同,槲寄生毒素的量及种类会有差异。根据序列同源性、二硫键的连接方式及生理作用,槲寄生毒素被归属于 II 型硫堇家族^[14]。硫堇家族多肽存在于多种植物的籽、叶、茎中,是一类含有 40~50 个氨基酸残基,3~4 对二硫键的碱性多肽,具有保护植物免受微生物入侵的作用。这类多肽有着广泛的生物活性谱,对革兰氏阳性或阴性的细菌、真菌、酵母及各种哺乳动物细胞具有毒性^[14]。

槲寄生毒素的最初发现源于寻找槲寄生中的降压成分,是由 Winterfeld 和 Bijl 于 1948 年最早分离并鉴定的,具有心搏舒缓、降低心肌收缩力的功效,与蛇毒在结构和对肌肉收缩方面的作用相似^[15]。而后来备受关注的是其抗肿瘤活性,对真核细胞的毒性比其他硫堇强得多,对很多肿瘤细胞系具有细胞毒活性,如人骨髓瘤细胞 K562、人 T-细胞白血病细胞 Molt4、肉瘤细胞 Yoshida、人粒细胞白血病、淋巴瘤细胞等,对人 Hela 肿瘤细胞的 ED₅₀ 在 0.2~1.7 μg/mL,而 pyru-laria 硫堇为 17 μg/mL^[4]。此外,槲寄生毒素还具有很强的免

疫调节功效^[16]。与其他硫堇不同的还有槲寄生毒素的溶血作用较弱。硫堇家族多肽有着广泛的抗菌活性谱,但到目前为止还未见到有关槲寄生毒素抗菌活性方面的报道。

北美桑寄生中也存在相似的毒素^[17],已分离并鉴定氨基酸序列的有 7 种: phoratoxins A~F、ligatoxin AS,见表 1。Phoratoxins 对多种肿瘤细胞系均具有细胞毒活性,其中 phoratoxin C 的活性最强;对不同种类的肿瘤细胞的活性差别也较大,phoratoxins 对来源于小细胞肺癌的 NCI-69 细胞具有很强的细胞毒活性,IC₅₀ 为 0.04 μmol/L。用 24 种来源

于不同患者的肿瘤样品对 phoratoxin C 进一步评价,结果对肺癌实体瘤的活性最好,IC₅₀为 0.087 μmol/L,而且对实体瘤样品的毒性是血液瘤样品的 18 倍,但一般的细胞毒药物对血液肿瘤细胞更为敏感。Phoratoxins 的活性研究提示这类多肽可能具有独特的作用机制,所以对藜寄生毒素进行体内、外活性研究,很可能找到一类对实体瘤具有更强活性的新的抗癌药物,非常具有深入临床研究的潜力。

2 藜寄生毒素的高级结构与构效关系

很多工作者使用 X 射线、NMR 技术来研究藜寄生毒素分子固态、溶液状态的高级结构,以及藜寄生毒素的作用机制与构效关系。采集 A3 晶体二硫键上硫原子的弱的不规则散射信号进行 S-SAD(硫-单波长不规则衍射)实验,可以研究立体结构与二硫键连接情况^[18],藜寄生毒素二硫键采取“同心模体”(concentric motif)的排列方式:Cys4-Cys32、Cys16-Cys26、Cys3-Cys40,在能与膜结合的多种小蛋白分子中,这种方式可以稳定与膜结合的结构域^[19]。

藜寄生毒素的晶体结构与 α、β 硫基极为相似,由残基 6-18、22-30 通过螺旋内氢键及 Cys16-Cys26 二硫键作用形成一对反平行的 α 螺旋。残基 1-5、32-37 通过 4 个氢键及 Cys4-Cys32 二硫键作用形成一对反平行的 β 折叠。C 端是一个由疏水相互作用和 Cys3-Cys40 二硫键固定的卷曲结构。两个结构域由氢键、盐桥相连接,涉及高度保守的残基 2、4、10、46,这些使分子稳定的作用赋予了分子结构的高度刚性,柔性则表现在分子的边缘区域。藜寄生毒素分子具有两亲表面,亲水区域位于 α-螺旋表面,疏水区域位于 α 螺旋手臂与 β 手臂之间^[20]。

两个构象近乎相同的藜寄生毒素分子可以形成两个不对称单元,围绕一个晶体学二重对称轴形成二聚体,viscotoxin A3 疏水残基 Ala5、Cys16、Ala21、Leu29 以及 Thr19、Thr25、Lys28 的疏水基团在两个单体之间形成二聚体的界面,防止与水直接接触。通过极性相互作用与硫酸盐阴离子的键合可使 4 个毒素分子围绕晶体学二重轴紧密堆叠形成四聚体,二聚体或四聚体是否是生理活性单元目前还不清楚。

在研究 viscotoxin A3 的晶体结构时,还发现了磷脂键合位点,位于两个结构域之间的带正电荷的凹槽中,四面体构象的磷脂阴离子通过氢键与凹槽键合。二聚体中两个分子与磷脂键合的情况是不同的,一个分子的 Ser42 与磷脂的氧原子相连,但另一个分子中这种作用消失,磷脂键合作用减弱。涉及与磷脂键合的氨基酸残基包括:Arg17、Try13、Ser2、Lys1,其中 Try13 是磷脂键合关键残基,也是毒素分子与细胞膜结合产生毒性的关键残基,所以磷脂键合位点可能是毒性作用机制中的重要结构域。

藜寄生毒素在溶液中的 NMR 立体结构与晶体结构总体一致,差别表现在二者主要结构域的相对位置有所不同,晶体结构中 β 折叠更靠近 α 螺旋,使整个分子形成更为紧凑的构象。已经用 NMR 方法鉴定高级结构的有 viscotoxins A3、A2、B、C1^[9,21]。viscotoxin C1 的 NMR 立体结构模型见图 1,1-5、32-35 氨基酸残基形成 β 折叠,C 端通过 Lys46 的

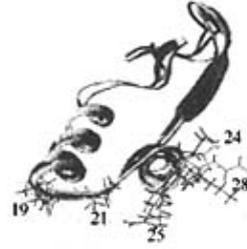


图 1 藜寄生毒素 C1 的 NMR 立体结构

Fig. 1 NMR Tridimensional structure of viscotoxin C1

骨架氨基与 Cys1 的羧基形成的氢键而被拉回分子。7-18 氨基酸形成第 1 个 α 螺旋,残基 Arg10、Arg17 是荷电残基,在硫基中高度保守,二者的侧链取向也相同。23-29 残基形成第 2 个 α 螺旋,残基 23 也是硫基中高度保守的荷电残基位点。

各种藜寄生毒素的一级序列高度保守,两个 β 折叠域的 18、29、43 是保守性突变位点,突变方式分别为:F-L、K-S、D-N,对细胞毒活性的影响不大。氨基酸的突变位点多发生在 12-30 残基上,为 α 螺旋结构域及其连接部位,而且所有荷电氨基酸残基的变化都发生在此段上。此段上具有结构稳定作用的或是涉及磷脂键合的氨基酸都是保守的,所以立体结构非常相似,该段序列中氨基酸的突变应该是各种藜寄生毒素产生活性明显差异的根源。28 位的荷电残基与 24 位的非荷电残基对分子的毒性至关重要,viscotoxin A3 具有这样的特征,细胞毒活性最高;viscotoxin B 与之相反,活性最低。其他硫基分子对真核细胞的毒性较藜寄生毒素低得多,是由于它们在 28 位没有荷电残基。24、25、28 决定毒性的残基都位于第 2 个 α 螺旋表面上的面对溶液的一侧,此表面正是毒素分子与细胞膜作用时进行识别的区域。

3 藜寄生毒素的作用机制

3.1 细胞毒活性作用机制:硫基家族多肽的毒性和其与细胞膜的作用息息相关。硫基可透过多种细胞的细胞膜,并破坏其结构。破坏细胞膜的机制可能是:(1)在细胞膜上形成离子通道导致离子泄漏,从而破坏了维持膜稳定所需的离子浓度梯度^[22];(2)通过带正电荷的多肽与带负电荷的底物分子之间的静电作用瓦解细胞膜^[23]。

藜寄生毒素分子的两亲结构特性使其与细胞膜有两种作用:疏水表面与细胞膜上碳氢键的疏水作用;带正电荷的亲水区域与膜上带负电荷的磷脂基团的作用。藜寄生毒素的等电点较高,分子在中性条件下带有正电荷,与带有负电荷的细胞膜磷脂成分有较强的作用。而 α 硫基 crambin 只有一个正电荷,是唯一没有毒性的硫基。藜寄生毒素分子立体结构表面特性的不同使得它们与细胞膜结合能力不同,从而对细胞膜的破坏程度也不同。所以尽管各种藜寄生毒素的一级结构非常相似,但活性差别较大,如 viscotoxins A3、A2、B 对 Yoshida 肿瘤细胞的 ED₅₀ 为分别 0.06、0.21、0.92 mmol/L^[24]。viscotoxins A3、A2 与膜的疏水作用方式相似,但 viscotoxin A2 的作用相对较弱,使其与膜的结合能力稍差。viscotoxins A3、B 活性差别较大,疏水区和亲水区两个区域上的

氨基酸残基均有所不同,viscotoxin A3 净电荷数为 +6,等电点为 9.2; viscotoxin B 净电荷数为 +5,等电点为 8.8, viscotoxin B 的 Arg25 可能会扰乱由两个 α 螺旋形成的疏水表面,而毒素分子正是通过此表面与膜相互作用的,研究表明 viscotoxin B 分子并不能进入到细胞膜上^[29]。viscotoxin A3 活性最强,与带负电荷的酸性氨基磷脂膜具有很高的亲和性,与膜平行地进行键合,这种结合面积最大,很多肿瘤细胞在膜外有大量的磷脂基团——磷脂酰丝氨酸,而在健康细胞中则少见。

3.2 免疫调节活性作用机制: 榭寄生毒素具有免疫调节作用,有关作用机制也有一些报道。毒素分子的 7~30 氨基酸残基组成的螺旋-转角-螺旋结构可以通过离子键与带负电荷的 DNA 作用形成复合物,来防止 DNA 的热变性,增强机体对 DNA 的修复功能,从而保护 DNA^[25]。榭寄生毒素还可以通过刺激粒性白细胞释放活性氧中间体来调节外分泌过程,增强浆膜通透性,形成 Ca^{2+} 离子通道而使线粒体受损,最终导致细胞死亡^[27]。Tabiasco 等^[16]研究了榭寄生成分在人的 NK 细胞杀伤肿瘤细胞过程中的生物功能,发现榭寄生毒素可以增强 NK 细胞的毒性,在 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下就对肿瘤细胞具有细胞毒活性,在 nmol/L 低浓度范围,就可以作用于细胞连接处来促进 NK 细胞的胞溶作用。

4 结语

榭寄生毒素是榭寄生中一类重要的活性成分,已鉴定一级序列的有 12 种,欧洲白果榭寄生中有 6 种: viscotoxins A1、A2、A3、B、1-PS、U-PS; 从亚洲榭寄生中分离了一种: viscotoxin C1; 中国榭寄生中分离了 6 种: viscotoxin B2、B3、B4、B5、B7、B8,其中 B3 与 C1 的一级结构相同。在北美榭寄生中也存在相似的毒素,从绒毛美洲寄生 *Phoradendron tomentosum* (DC.) Engelm. ex Gray 分离了 6 种,被命名为 phoratoxins A~F, 从 *Phoradendron liga* 中分离 1 种,称为 ligatoxin A。榭寄生毒素对多种肿瘤细胞具有细胞毒活性,毒素分子可以通过与肿瘤细胞膜的静电作用及疏水作用来破坏细胞膜结构而产生细胞毒性。榭寄生毒素有免疫调节功能,可能存在 3 种机制: (1) 毒素分子可以与 DNA 结合来增强机体对 DNA 的修复功能; (2) 通过刺激粒性白细胞释放活性氧中间体来调节外分泌过程; (3) 增强 NK 细胞的毒性。很多工作者使用 X 射线、NMR 技术来研究毒素分子的高级结构,以期阐明榭寄生毒素的作用机制与构效关系。

References:

[1] Steuer-Voget M K, Bonkowsky V, Ambrosch P, et al. The effect of an adjuvant mistletoe treatment programme in resected head and neck cancer patients: a randomised controlled clinical trial [J]. *Eur J Cancer*, 2001, 37: 23-21.
 [2] Mabed M, El-Helw L, Shamaa S. Phase II study of viscum fraxini-2 in patients with advanced hepatocellular carcinoma [J]. *British J Cancer*, 2004, 90: 65-69.
 [3] Jung M L, Baudino S, Ribereau-Gayon G, et al. Characterization of cytotoxic proteins from mistletoe (*Viscum album* L.) [J]. *Cancer Lett*, 1990, 51: 103-108.
 [4] Konopa J, Woynarowski J M, Lewandowska-Gumieniak M. Isolation of viscotoxins, cytotoxic basic polypeptides from *Viscum album* L. [J]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 1980, 361(10): 1525-1533.
 [5] Kovacs F. The *in vitro* effect of *Viscum album* (VA) extract

on DNA repair of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in cancer patients [J]. *Phytother Res*, 2002, 16: 143-147.
 [6] Stein G B, Schalle G, Pfuller U, et al. Characterisation of granulocyte stimulation by thionins from European mistletoe and from wheat [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1426: 80-90.
 [7] Olson T, Samuelsson G. The amino acid sequence of viscotoxin A2 from the European mistletoe (*Viscum album* L., Loranthaceae) [J]. *Acta Chem Scand*, 1972, 26(2): 585-595.
 [8] Samuelsson G, Pettersson B. The amino acid sequence of viscotoxin B from the European mistletoe (*Viscum album* L., Loranthaceae) [J]. *Eur J Biochem*, 1971, 21: 86-89.
 [9] Romagnoli S, Fogolari F, Catalano M, et al. NMR solution structure of viscotoxin C1 from *Viscum album* ssp. *coloratum* Ohwi: towards structure-function analysis of viscotoxins [J]. *Biochemistry*, 2003, 42: 12503-12510.
 [10] Kong J L. Study of polypeptides and proteins from Chinese mistletoe [A]. *Dissertation of Doctor Degree of Research Institute of Chemical Defense of PLA* (防化研究院博士学位论文) [D]. Beijing: Research Institute of Chemical Defense of PLA, 2004.
 [11] Thunberg E, Phoratoxin B. A toxic protein from the mistletoe, *Phoradendron tomentosum* subsp. *macrophyllum* [J]. *Acta Pharm Suec*, 1983, 20: 115-122.
 [12] Thunberg E, Samuelsson G. Isolation and properties of ligatoxin A, a toxic protein from the mistletoe *Phoradendron liga* [J]. *Acta Pharm Suec*, 1982, 19: 285-292.
 [13] Florack D E A, Stiekema W J. Thionins; properties, possible biological roles and mechanisms of action [J]. *Plant Mol Bio*, 1994, 26: 25-37.
 [14] Eppele P, Apel K, Bohlmann H. Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arsibidopsis* against *Fusarium oxysporum* [J]. *Plant Cell*, 1997, 9(4): 509-520.
 [15] Rosell S, Samuelsson G. Effect of mistletoe viscotoxin and phoratoxin on blood circulation [J]. *Toxicol*, 1966, 4: 107-110.
 [16] Tabiasco J, Pont F, Fournie J, et al. Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity [J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269(10): 2591-2600.
 [17] Johansson S, Gulibo J, Lindholm P, et al. Small, novel proteins from the mistletoe *Phoradendron tomentosum* exhibit highly selective cytotoxicity to human breast cancer cells [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2003, 60(1): 165-175.
 [18] Judit E D, Beatrix G, Axel Z, et al. Structure of viscotoxin 3: disulfide location from weak SAD data [J]. *Acta Cryst*, 2003, D59: 2125-2132.
 [19] Orru S, Scaloni A, Giannattasio M, et al. Amino acid sequence, S-S bridge arrangement, and distribution in plant tissues of thionins from *Viscum album* [J]. *Biol Chem*, 1997, 378(9): 986-996.
 [20] Giudici M, Pascual R, Canal L, et al. Interaction of viscotoxins A3 and B with membrane model systems: implications to their mechanism of action [J]. *Biophys J*, 2003, 85: 971-981.
 [21] Romagnoli S, Ugolini R, Fogolari F, et al. NMR structural determination of viscotoxin A3 from *Viscum album* L. [J]. *Biochem J*, 2000, 350: 569-577.
 [22] Hughes P, Whitecross M, Levcillyn D, et al. The cytotoxic plant protein, purothionin, forms ion channels in lipid. Membranes [J]. *J Bio Chem*, 2000, 275: 823-827.
 [23] Coulon A, Berkane F, Sautereau A M, et al. Modes of membrane interaction of a natural cysteine-rich peptide: the viscotoxine A3 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1559: 145-159.
 [24] Schaller G, Urech K, Giannattasio M. Cytotoxicity of different viscotoxins and extracts from the European subspecies of *Viscum album* L. [J]. *Phytother Res*, 1996, 10: 473-477.
 [25] Alexandre C, Amor M, Andre L, et al. Comparative membrane interaction study of viscotoxins A3, A2, and B from mistletoe (*Viscum album*) and connections with their structures [J]. *Biochem J*, 2003, 374: 71-78.
 [26] Woynarowski J M, Konopa J Z. Interaction between DNA and viscotoxins, cytotoxic basic polypeptides from *Viscum album* L. [J]. *Physiol Chem*, 1980, 361: 1535-1545.
 [27] Bussing A, Schaller G, Pfuller U. Generation of reactive oxygen intermediates (ROI) by the thionins from *Viscum album* L. [J]. *Anticancer Res*, 1998, 18: 4291-4296.