

· 综述 ·

美洲商陆抗病毒蛋白及其在艾滋病治疗中的应用

林爱玉,王秋颖

(中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所,北京 100094)

摘要:美洲商陆抗病毒蛋白是一种天然的广谱抗病毒试剂,其抗 HIV 活性,已引起国内外学者的广泛兴趣和重视。旨在综述美洲商陆抗病毒蛋白的结构、核糖体失活活性、抗病毒活性及其在艾滋病治疗中的应用,并展望其在临床上的应用前景。

关键词:美洲商陆抗病毒蛋白(PAP);核糖体失活蛋白(RIP);抗病毒活性;艾滋病

中图分类号: R286.87 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)09-附 3-04

Pokeweed antiviral protein and its therapeutic application to AIDS

LIN Ai-yu, WANG Qiu-ying

(Institute of Medicinal Plant, CAMS and PUMC, Beijing 100094, China)

Key words pokeweed antiviral protein (PAP); ribosome-inactivating protein (RIP); antiviral activity; AIDS

美洲商陆抗病毒蛋白(PAP)分离于美洲商陆,相对分子质量约 3×10^4 ,是一种单链核糖体失活蛋白(RIP),有多种类型,即 PAP I, PAP II, PAP III, PAP-S, PAP-R和 PAP-C,分别分离自春天、初夏、晚夏的叶子、种子、根和细胞培养物,都显示了高特异性的 RNA N-糖苷酶活性,可催化切割真核和原核核糖体大 rRNA 中高度保守的 SRL(sarcin-ricin loop)上的四环 GAGA的腺嘌呤碱基的 N-糖苷键,脱去一个腺嘌呤碱基。SRL脱嘌呤后,核糖体构象发生改变,从而影响了 EF1-氨酰 tRNA 和 EF2-GTP与核糖体的结合,导致蛋白质合成过程中移位阶段的不可逆抑制。

PAP是一种天然的广谱抗病毒试剂,能抗多种植物和动物病毒,在不抑制宿主细胞蛋白质合成的浓度下就可有效地抑制病毒的复制,特别是由于其抗 HIV 活性,已引起国内外学者的广泛兴趣和重视,对治疗 AIDS可能有广泛的应用前景。

1 结构

结构 X射线衍射分析, PAP由 8个 α -螺旋和 1个六链 β 折叠组成,形成 3个结构域: N 端结构域(1-69aa 残基)、中心结构域(70-179 aa 残基)和 C 端结构域(180-262 aa 残基)^[1]。中心结构域包含酶的所有活性催化残基: Tyr72, Tyr123, Glu176, Arg179,且在 RIP中是高度保守的。经结构和生化分析表明, Tyr72和 Tyr123将底物 rRNA 的腺嘌呤环夹在中间(三明治状),至少形成 4个氢键,形成能量有利的堆积构象,而 Glu176和 Arg179则直接催化 SRL的脱腺嘌呤作用。

在中心结构域和 C端结构域的连接面有一个明显的空隙,能容纳底物 rRNA 分子,这与 RNA 和核糖体蛋白 L3

(RPL3)的结合有关。Rajamohan等^[2]应用分子模型(PAP-RNA复合物)研究,定点诱变,结合生物测定来评价催化位点和活性中心空隙残基对 rRNA 脱嘌呤的重要性。直接参与脱嘌呤的 Tyr72, Tyr123, Glu176, Arg179的 Ala替代导致其活性下降 3个数量级;同样,保守的活性位点残基 Trp208的 Ala替代,其活性也下降 3个数量级,这可能是由于其与底物 RNA 的磷酸骨架形成的氢键的不稳定及与核糖体疏水相互作用的不稳定造成的。空隙残基的 Ala替代也明显地影响 rRNA 的脱嘌呤活性。

2 核糖体失活活性

PAP催化切割真核和原核核糖体大 rRNA 中高度保守的 SRL上的四环 GAGA的腺嘌呤碱基的 N-糖苷键,脱去一个腺嘌呤碱基后,核糖体构象发生改变,从而影响了 EF1-氨酰 tRNA 和 EF2-GTP与核糖体的结合,导致蛋白质合成过程中移位阶段的不可逆抑制。RNA N-糖苷酶活性经历 3个步骤:底物 rRNA 的识别、结合和特异 N-糖苷键的断裂。

2.1 识别:几乎所有的 RIP对裸露的 28S rRNA 有相同的脱嘌呤活性水平,但对完整的核糖体则显示出不同的活性水平。对于 PAP来说,与完整的核糖体相比,它对裸露的 rRNA 的脱嘌呤活性下降了 3个数量级。这说明在 RIP-rRNA 相互作用过程中核糖体因素起重要作用,即 rRNA 和 RIP与核糖体蛋白之间的相互识别和相互作用。

诱导酵母体内 RAP表达后产生抑制细胞生长的效应,可能是由于 PAP表达后翻译被抑制^[3]。但由于 PAP的底物 SRL接近肽酰转移酶中心,与肽酰转移反应有关的核糖体蛋白突变可能抗 PAP的抑制细胞生长的效应。核糖体蛋白 RPL3则参与肽酰转移酶中心的形成,而且是催化肽键形成

的一个必要蛋白。Hudak等^[4]发现酵母中含 RPL3的 Mak8-1等位基因的突变株具有抗 PAP效应,这是由于这种细胞的核糖体不与 PAP结合,因此不能脱嘌呤,而在野生型酵母中 PAP表达并脱嘌呤,这说明野生型核糖体蛋白 RPL3对核糖体脱嘌呤是必要的。共免疫沉淀实验证明在体外 PAP直接与 RPL3和 Mak8-1p相结合,然而用完整的核糖体时,PAP只与野生型 RPL3而不与 Mak8-1p相结合,这说明 PAP不与核糖体中的 Mak8-1p相互作用。Mak8-1基因编码的突变型 RPL3与野生型只有两个氨基酸的不同即 W255C和 p257S,但这足以改变蛋白质形状,从而影响其与核糖体其他成分的相互作用,因此改变了核糖体的四级结构,掩盖了 PAP的结合位点。另外,RPL3和 Mak8-1p翻译后修饰的不同也可能影响其在体内与 PAP的相互作用。PAP结合于核糖体需要野生型 RPL3的参与,故认为 RPL3是一种位于核糖体肽酰转移酶中心的高度保守的蛋白质,涉及到 PAP与核糖体的结合及随后的 SRL的脱嘌呤。而在表达突变型 RPL3的酵母细胞中核糖体不脱嘌呤,这说明 PAP与 RPL3的相互作用对于其结合于核糖体并通过脱嘌呤使其失活是必要的,首次证明 RPL3为 PAP提供了一个受体结合位点,即 PAP通过识别并结合于 RPL3而接近核糖体。因为 RPL3在不同种核糖体中是高度保守的,因此 PAP与 RPL3的相互作用可能是 PAP广谱抗核糖体活性的重要原因。

2.2 结合: PAP活性位点残基的 Ala替代导致其活性下降3个数量级,罅隙残基的 Ala替代也明显地影响 rRNA的脱嘌呤(69NN70替代,其活性下降 191倍;90FND92替代,其活性下降 352位),而远离活性位点和罅隙残基的 Ala替代则对 PAP的活性无多大影响。由此提出一个假说,活性中心罅隙的高度保守的带电的极性残基通过静电相互作用使底物 rRNA正确定位并稳定结合于活性位点的口袋中。为了进一步了解罅隙残基对 rRNA脱嘌呤的分子基础。Rajamohan等^[5]应用定点诱变、表面等离子体共振技术分析了突变 PAP与 SRL的结合状况。与野生型 PAP相比,FLP-4(69AA70)和 FLP-7(90AAA92)与底物 rRNA的亲合力大大降低,这解释了它们脱嘌呤活性的下降。相似地,FLP-9(122AA123)影响底物在活性位点的定位,与 rRNA的结合亲合力下降;催化位点突变 FLP-12(Ala179)和 FLP-13(Ala208)与 rRNA的结合亲合力也下降,这与以前认为的 Arg179和 Trp208在 rRNA结合与脱嘌呤中具有重要性相一致。相比之下,远离活性位点和罅隙残基的 Ala替代如 FLP-1(28AA29)和 FLP-8(111AA112)则显示出正常的 rRNA结合亲合力^[1]。由此可看出,除了催化位点,罅隙也参与了 PAP与 rRNA四环结构的结合。

根据 PAP-rRNA茎环复合物的分子模型^[5],PAP罅隙残基 43,67(与 97残基配对),69,70,92,206-210,212-213,217,224-225和 253-255参与其与 rRNA的相互作用,其中 Asn69,Asn70,Asp92与活性位点残基 Arg122则特异地与 rRNA的 SRL环的磷酸骨架相互作用,即有一半的罅隙残基与 SRL相结合,而组成四环区的另一半残基包括 40-44,

69-70,91-96和 120-122则部分与 SRL结合,部分暴露于溶剂环境中,推测这些部位暴露的罅隙残基可能与 RPL3的结合有关。经模型研究^[6],证明罅隙残基 69-70,90-96和 118-120与 RPL3相互作用。因此,这些残基的突变导致 PAP与 RPL3结合亲和力的下降和 PAP与 rRNA结合的不稳定。单氨基酸的突变结果进一步证实了罅隙在 PAP-rRNA和 PAP-RPL3相互作用中的重要性。RPL3与 rRNA结合可稳定其构象,以使 SRL能有效地与 PAP结合并反应。因此,RPL3,rRNA和 PAP并不是独立存在的,它们形成一个完整的复合物,即 RPL3-PAP-rRNA,并有一个重叠结合区。

2.3 脱嘌呤:根据底物类似物与 RIP形成的结晶结构以及生化实验,曾先后提出 3种脱嘌呤机制的假说:其一,Arg179的 Ala替代使活性严重下降,而 Lys替代则活性只下降了 4倍,说明该位点的正电荷对其活性是必要的。Arg179使腺嘌呤环上的 N₃质子化,引起腺嘌呤环内电子的转移,最终导致 N₉-C₄糖苷键的断裂。糖苷键断裂后,核糖带正电,通过酸性氨基酸 Glu176使之稳定;腺嘌呤环的负电通过 Arg179对 N₃的质子化来稳定,Arg质子化 N₃后,增强了其侧链的碱性,可从 H₂O分子中吸一个质子,这样产生一个氢氧根离子亲核攻击核糖 C₁,从而释放一个腺嘌呤碱基^[7]。其二,Ren等^[8]提出糖苷键的变弱并不是直接由质子化引起的,而是由于在腺嘌呤核苷酸中核糖以高能构象存在。Arg179通过中和腺嘌呤环的负电荷而稳定过渡态。其三,Huang等^[9]提出一个典型的酸催化机制:活性中心酸性氨基酸残基 Asp92通过 Ser121使腺嘌呤环 N₇质子化,构象变化和电子转移最终导致 N-C键的断裂,同时 C₄与 H₂O分子间形成新的键。反应后,蛋白质原子和核糖原子间的范德华力使修饰后的核糖体离开活性中心,而腺嘌呤碱基与蛋白质结合较紧,推测可能是下一个核糖体接近 RIP后引起的构象改变导致了腺嘌呤碱基的释放。Poyet等^[10]应用定点诱变分析 PAP II的活性位点残基,却发现以上的 3种机制没有一种能完全解释所得到的实验结果,因此对于这种酶的催化活性还有待于做更深入的研究。

3 抗病毒活性

PAP对 TMV、流感病毒、脊髓灰质炎病毒、疱疹病毒和 HIV 等病毒都有抑制作用。PAP与 mAb(识别 CD4 CD5 CD7)的结合物在无细胞毒性浓度下可有效抑制正常 T细胞中 HIV-1的复制^[11]。因此,PAP的抗病毒活性,尤其是其抗 HIV 的活性,仅用 RIP活性来解释是不够的。

最近发现 PAP对含腺嘌呤碱基的多聚核苷酸、单链 DNA和双链 DNA都有脱嘌呤作用,因此 PAP的脱嘌呤活性可能并不限于 rRNA的 SRL环。Rajamohan等^[12]应用 HPLC检测到了从病毒 RNA释放的腺嘌呤碱基,证明了 PAP对 HIV-1植物病毒(TMV)和噬菌体(MS2)的基因组 RNA浓度依赖性脱嘌呤,即 PAP能识别病毒 RNA并使其脱嘌呤。虽然 RTA在无细胞翻译体系中与 PAP一样抑制蛋白质的合成,但即使在 RTA的浓度为 5 μ mol/L时也没有检测到病毒 RNA的脱嘌呤。在人的外周血单核细胞(PBMC)

中 PAP I, PAP II, PAP III抑制 HIV-1复制的 IC_{50} 分别为 17, 25, 16 nmol/L 这些结果说明单凭与 rRNA 脱嘌呤有关的 PAP或 RTA高度保守的活性位点残基对病毒 RNA 的识别和脱嘌呤是不够的, PAP潜在的抗病毒活性可能部分是由于其独特的对病毒 RNA 的脱嘌呤能力(包括 HIV-1 的 RNA)。

三核苷酸 GGG在 RNA N-糖苷酶 PAP脱嘌呤活性位点的分子模型研究表明鸟嘌呤碱基进入 PAP的活性位点的口袋中并不影响其独特的构象,鸟嘌呤碱基被夹在 Tyr72和 Tyr123中间,与腺嘌呤碱基很像。鸟嘌呤碱基与活性位点残基 Ser121和 Val173形成两个独特的氢键。带负电的磷酸基团与 PAP表面的两个正电荷族(一面的 Lys210和 Arg179,另一面的 Arg122和 Arg135)通过静电相互作用使之稳定。rRNA和 HIV-1 RNA经纯化的重组 PAP处理后,可用 HPLC检测到鸟嘌呤碱基的释放。重组 PAP对 HIV-1的腺嘌呤碱基和鸟嘌呤碱基的释放比为 1:1,而对 E. coli rRNA 的则约为 3:1,这说明 PAP的 RNA脱嘌呤活性可能不仅仅限于腺嘌呤碱基,它还能脱 rRNA和病毒 RNA的鸟嘌呤碱基^[13]。所以 PAP潜在的抗 HIV-1活性可能部分由于目前并不了解的对病毒 RNA的脱鸟嘌呤活性。

另外, PAP的 C端缺失突变抑制病毒感染,但不使寄主核糖体脱嘌呤^[14],所以 PAP的抗病毒活性可能不是由于对寄主核糖体的脱嘌呤。应用 PAP突变发现 PAP抑制 BWV和 PVX的翻译,但其核糖体并没有脱嘌呤。通过增加帽子类似物 m⁷GpppG(而不是 GpppC或 GTP)的浓度可去除 PAP对 BMV RNA的翻译抑制,说明 PAP识别帽子结构。进一步研究 PAP处理 BMV RNA或加帽的虫荧光素酶转录产物时,导致 RNA脱嘌呤;相反,在此浓度下,未加帽的虫荧光素酶的转录产物则不脱嘌呤^[15]。这些结果首次证明 PAP能通过识别帽子结构并特异地使带帽子的 RNA脱嘌呤(不是通过使核糖体脱嘌呤)而抑制翻译。

4 在 AIDS治疗中的应用

PAP在抗 HIV-1活性是由于其独特的抑制病毒蛋白的合成和具有使 HIV RNA脱嘌呤的能力。PAP抑制 HIV-1的繁殖,与胞内 HIV-1蛋白质的水平下降有关^[16]。利用植物凝集素刺激来自血清阴性的 PBMC,然后感染 HIV-1,用此系统研究 PAP-S的抗病毒活性,发现 PAP-S能明显地降低感染细胞中逆转录酶的活性和 p24核心蛋白的表达,其抗 HIV活性可与 AZT相比^[17]。作用机制要求在病毒感染之前或感染过程中有 PAP的存在。PAP能抑制缺少逆转录酶的病毒复制,感染后用 PAP或 PAP-mAb处理 1 d,并不降低其功效,因此 PAP并不是在感染的早期抑制 HIV-1的复制。虽然 PAP在体外可使核糖体 60S亚基失活,抑制多肽的延伸,但抑制 HIV-1抗原产生的浓度低于抑制正常 CD4⁺T细胞增殖的浓度^[16],这说明 PAP的抗 HIV活性不仅仅是由于其核糖体特异的 N-糖苷酶活性。除了能抑制病毒蛋白质的合成外, PAP还能直接使病毒 RNA脱嘌呤。

HIV进入细胞并开始复制是从病毒包膜蛋白 gp120识

别并与细胞表面上的 CD4受体蛋白结合开始的,因此以 CD4为靶点的抗病毒试剂在对预防感染和抑制 HIV-1的繁殖上有潜在的应用价值。有报道 PAP能抑制正常初级 CD4⁺T细胞中 HIV-1的复制,若 PAP通过单克隆抗体(抗 CD4细胞中表达的 CD4, CD5, CD7)与 CD4⁺T细胞结合,则可大大提高其抗病毒活性及对细胞的选择性,其抗 HIV能力增加了 1000倍^[11]。PAP免疫结合物在 1 pmol/L浓度下就能抑制 HIV-1的复制,而此浓度不会抑制正常 CD4⁺T细胞的增殖和依赖 CD分子的反应,因此 PAP-anti-CD4仅与细胞表面 CD4分子的 3%相结合,不会抑制一些依赖 CD4的生物效应。单独 PAP的半衰期小于 30 min,而 PAP-mAb的则为 16~18 h^[11],而且 PAP-anti-CD4抑制血清阳性病人 CD4⁺T细胞的 HIV-1的复制,用 5 pmol/L的 PAP-anti-CD4处理病人的 CD4⁺细胞,在 22 d内均可抑制 HIV-1的复制^[18]。因此 PAP-anti-CD4在对 HIV-1感染的病人的治疗上更有应用前景。

通过 CD4⁺细胞正常抗原的单克隆抗体将抗病毒试剂 PAP靶向没有感染或潜伏感染的 CD4⁺细胞的方法与其他新方法(依赖感染细胞中 HIV-1表面抗原 gp41或 gp120的表达不同),避免了由于不同分离得来的 HIV-1表面抗原的多样性或血浆抗表面蛋白抗体的存在所引起的潜在问题。将这种免疫结合物应用于临床治疗可能会提高对 AIDS病人的诊疗,但是对 mAb及免疫结合物的毒素部分的体液免疫反应限制了它们在临床上的应用。TXU-PAP处理过的猴子则产生抗 PAP及抗鼠 IgG的抗体^[19]。通过检测 TXU(anti-CD7)-PAP的体外及在人类 AIDS的替代 Hu-PBL-SCID鼠模型中的抗 HIV-1活性来评估其作为一种新的生物治疗抗 HIV试剂的临床应用潜力。显示 TXU-PAP在猕猴耐药力的剂量下对 AIDS的 Hu-PBL-SCID鼠模型有潜在的抗 HIV-1活性,并且无任何副作用,说明 TXU-PAP是一种有潜力的无毒抗 HIV试剂。TXU-PAP处理过的猕猴的血浆样品也显示了体外抗 HIV-1活性^[20]。

即使浓度为抗 HIV-1的 IC_{50} 的 2000倍时, PAP对精子和正常的女性生殖道皮膜细胞都没有毒性。而且, PAP处理后,对精子在宫颈黏液中的游动或体内精卵的结合和融合无不利影响^[21]。以白兔为模型,对 PAP处理过的精液进行人工授精,结果对怀孕率、妊娠期长短、围产期结果及后代的成长发育没有不利影响^[22]。因此,在一方感染 HIV-1的夫妇的辅助生殖中, PAP可作为一种安全的预防性的抗病毒试剂。

5 展望

鉴于 PAP对一些其他的人类病毒也有抑制活性,所以 PAP-mAb对治疗其他的病毒病有潜在的临床应用价值。目前已克隆了 PAP的 cDNA,并分别在细菌和酵母细胞中表达了具有生物活性的重组 PAP^[23-25]。重组 PAP的获得为大规模生产临床应用的 PAP提供了基础,并可对这种有希望的无毒抗病毒试剂作更深入的研究和开发。

References

- [1] Monzingo A F, Collins E J, Ernst S R, et al. The 2.5 Å structure of pokeweed antiviral protein [J]. *J Mol Biol*,

- 1993, 233(4): 705-715.
- [2] Rajamohan F, Pugmire M J, Kurinov I V, *et al.* Modeling and alanine scanning mutagenesis studies of recombinant pokeweed antiviral protein [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(5): 3382-3390.
- [3] Hur Y, Hwang D J, Zoubenko O, *et al.* Isolation and characterization of pokeweed antiviral protein mutations in *Saccharomyces cerevisiae* identification of residues important for toxicity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(18): 8448-8452.
- [4] Hudak K A, Dinman J D, Tumer N E. Pokeweed antiviral protein accesses ribosomes by binding to L3 [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(6): 3859-3864.
- [5] Rajamohan F, Mao C, Uckun F M. Binding interactions between the active center cleft of recombinant pokeweed antiviral protein and the alpha-sarcin/ricin stem loop of ribosomal RNA [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(26): 24075-24081.
- [6] Rajamohan F, Ozer Z, Mao C, *et al.* Active center cleft residues of pokeweed antiviral protein mediate its high-affinity binding to the ribosomal protein L3 [J]. *Biochemistry*, 2001, 40(3): 9104-9114.
- [7] Monzïngo A F, Robertus J D. X-ray analysis of substrate analogs in the ricin A-chain active site [J]. *J Mol Biol*, 1992, 222: 1136-1145.
- [8] Ren J, Wang Y, Dong Y. The N-glycosidase mechanism of ribosome-inactivating proteins implied by crystal structures of alpha-momocharin [J]. *Structure*, 1994, 2: 7-16.
- [9] Huang Q C, Liu S P, Tang Y Q. Studies on crystal structures, active-center geometry and depurinating mechanism of two ribosome-inactivating proteins [J]. *Biochem J*, 1995, 309: 285-298.
- [10] Poyet J L, Hoeveler A, Jongeneel C V. Analysis of active site residues of the antiviral protein from summer leaves from *Phytolacca americana* by site-directed mutagenesis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 253(3): 582-587.
- [11] Zarlino J M, Moran P A, Haffar O, *et al.* Inhibition of HIV replication by pokeweed antiviral protein targeted to CD4+ T-cells by monoclonal antibodies [J]. *Nature*, 1990, 347(6288): 92-95.
- [12] Rajamohan F, Venkatachalam T K, Irvin J D, *et al.* Pokeweed antiviral protein isoforms PAP-I, PAP-II and PAP-III depurinate RNA of human immunodeficiency virus (HIV)-1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 260(2): 453-458.
- [13] Rajamohan F, Kurinov I V, Venkatachalam T K, *et al.* Deguanlylation of human immunodeficiency virus (HIV-1) RNA by recombinant pokeweed antiviral protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 263(2): 419-424.
- [14] Tumer N E, Hwang D J, Bonness M. C-terminal deletion mutant of pokeweed antiviral protein inhibits viral infection but does not depurinate host ribosomes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(8): 3866-3871.
- [15] Hudak K A, Wang P, Tumer N E. A novel mechanism for inhibition of translation by pokeweed antiviral protein: depurination of the capped RNA template [J]. *RNA*, 2000, 6(3): 369-380.
- [16] Ence A, Balfour H H Jr, Myers D E, *et al.* Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of an anti-CD4 immun-conjugate containing pokeweed antiviral protein [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993, 37(4): 835-838.
- [17] Olson M C, Ramakrishnan S, Anand R. Ribosomal inhibitory proteins from plants inhibit HIV-1 replication in acutely infected peripheral blood mononuclear cells [J]. *AIDS Res Hum Retrovirus*, 1991, 7(12): 1025-1030.
- [18] Zarlino J M, Moran P A, Haffar O, *et al.* Inhibition of HIV-1 replication in seropositive patients' CD4+ T-cells by pokeweed antiviral protein-monovalent antibody conjugates [J]. *Int J Immunopharmacol*, 1991, 13(Suppl 1): 63-68.
- [19] Waurzyniak B, Schneider E A, Tumer N. *In vivo* toxicity, pharmacokinetics and antileukemic activity of TXU (anti-CD7)-pokeweed antiviral protein immunotoxin [J]. *Clin Cancer Res*, 1997, 3: 881-890.
- [20] Uckun F M, Chelstrom L M, Tuel-Ahlgren L, *et al.* TXU (anti-CD7)-pokeweed antiviral protein as a potent inhibitor of human immunodeficiency virus [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42(2): 383-388.
- [21] D' Cruz O J, Uckun F M. Pokeweed antiviral protein: a potential nonpneumocidal prophylactic antiviral agent [J]. *Fertil Steril*, 2001, 75(1): 106-114.
- [22] D' Cruz O J, Uckun F M. Effect of pretreatment of semen with pokeweed antiviral protein on pregnancy outcome in the rabbit model [J]. *Fertil Steril*, 2001, 76(4): 830-833.
- [23] Honjo E, Dong D, Motoshima H, *et al.* Genomic clones encoding two isoforms of pokeweed antiviral protein in seeds (PAP-S1 and S2) and the N-glycosidase activities of their recombinant proteins on ribosomes and DNA in comparison with other isoforms [J]. *J Biochem*, 2002, 131(2): 225-231.
- [24] Rajamohan F, Doumbia S O, Engstrom C R, *et al.* Expression of biologically active recombinant pokeweed antiviral protein in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *Protein Expr Purif*, 2000, 18(2): 193-201.
- [25] Rajamohan F, Engstrom C R, Denton T J, *et al.* High-level expression and purification of biologically active recombinant pokeweed antiviral protein [J]. *Protein Expr Purif*, 1999, 16(2): 359-368.

药用紫草的研究进展

葛 锋, 王晓东, 王玉春

(中国科学院过程工程研究所 生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

摘要: 对药用紫草的研究状况, 包括自然资源状况、有效成分的分离和提纯、紫草素及其衍生物的生物合成途径、药理研究现状以及植物细胞工程运用于紫草的研究进展进行综述, 并对药用紫草今后研究发展的方向作了展望。

关键词: 新疆紫草; 硬紫草; 滇紫草; 紫草素; 植物细胞工程

中图分类号: R282.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)09-附 6-05

收稿日期: 2002-12-05

基金项目: “十五”国家攻关项目 (2001BA701A10)

作者简介: 葛 锋 (1979-), 男, 云南昆明人, 中国科学院过程工程所在读研究生, 主要从事植物细胞工程。Tel: 010-82627059

* 通讯作者