

苦瓜核糖体失活蛋白的研究

烟台大学生化系(264005) 王庆华* 任虹
四平师范学院生物系 于长春

摘要 综述了苦瓜核糖体失活蛋白的分离纯化、理化性质、作用机理和方式,并对该蛋白的应用前景作了展望。

关键词 苦瓜 核糖体失活蛋白 苦瓜定

苦瓜 *Momordica charantia* L. 系葫芦科苦瓜属植物。近年来,国内外许多学者从苦瓜种仁中提纯蛋白质并对其生理作用进行研究,从中筛选出有效成分作为药用和其它用途。已分离纯化出苦瓜凝集素(momordica charantia lectin, MCL), α -苦瓜素(α -momorcharin), β -苦瓜素(β -momorcharin), 苦瓜核糖体失活蛋白(ribosome inactivating protein, RIP)以及苦瓜免疫缺陷病毒 I 型抑制剂(inhibitor of HIV-1)等多种苦瓜种仁蛋白。本文主要综述苦瓜 RIP 的研究进展。

1 关于苦瓜 RIP 的多种报道

苦瓜 RIP 是从苦瓜种仁中分离出来的一类能够使核糖体失活、抑制细胞蛋白质合成的碱性蛋白,也有人称它们为苦瓜抑制剂(momordica charantia inhibitor, MCI)和苦瓜定(momordin)。最早是由 Barbieri^[1]通过 Sephadex G-150 凝胶过滤柱层析和 CM-Sephadex C-50 离子交换柱层析分离而得的,经检测其分子量为 27 000,是兔子网织红细胞裂解产物蛋白质合成的强有力的抑制剂($ID_{50}=1.8\text{ng/ml}$)。郑硕^[2]等参考 Barbieri 的方法,将 CM-Sephadex C-50 柱改为 CM-纤维素柱并用 NaCl 作线性梯度洗脱,得到 RIP 的两种类似物,它们在 SDS-PAGE 和 IEF 上均呈现一条谱带,分子量分别为 26 000 和 28 000,等电点均为 $PI=8.3$,含糖量分别为 1.6% 和 2.0%,小鼠腹腔给药的 LD_{50} 分别为 2.54mg/kg 和 9~14mg/kg;对

无细胞体系蛋白质合成都具有强烈的抑制活性, ID_{50} 均小于 $0.1\mu\text{g/ml}$ 。Yuju^[3]则从苦瓜种子中分离出苦瓜定 a 和苦瓜定 b,并对其氨基酸组成和其它一些特性作了检测。与苦瓜定 a 的 N-末端连接的寡糖链的基本结构和完整的氨基酸顺序也已陆续报道^[4,5]。

2 作用机理的探讨

从分子生物学的角度对苦瓜 RIP 作用机理的研究表明^[6]:用此蛋白处理核糖体使之失活后,从中提取出的 28S rRNA 用苯胺处理时释放出大约 450 个核苷酸的片段,对此片段深入分析揭示苯胺敏感区域位于 A-4324 和 G-4325 之间的磷酸二酯键。这一结果表明此蛋白质是通过位于真核细胞核糖体 28S rRNA 中 A-4324 部位的糖苷键的断裂而使核糖体失活的;且该蛋白在无额外核糖蛋白存在的缓冲体系中和无 ATP 供给能量的前提下,依然可以使分离的卤虫属 *Artemia salina* 核糖体失活^[7]。

3 免疫毒素的构建

近几年来,由苦瓜定与单克隆抗体构建而形成的免疫毒素已经越来越多地被用来研究苦瓜定的生理作用。Stirpe^[8]把苦瓜定偶联到抗 Thy1.1 的单克隆抗体上,发现偶联后的苦瓜定对体外 Thy1.1 表达的小鼠淋巴细胞系 AKR-A 有专一性的细胞毒作用,蛋白质合成被抑制的 ID_{50} 值为 $1\times 10^{-9}\text{mol/L}$,而缺乏 Thy1.1 抗原的小鼠淋巴系 EL4 即使偶联物的浓度达到 $3\times 10^{-8}\text{mol/L}$ 也不受其影

* Address: Wang Qinghua, Department of Biochemistry, Yantai University, Yantai

响,而与另外抗体(R10)偶联的免疫毒素则对 AKR-A 细胞无毒害作用。Dinota^[9]所构建的免疫毒素是将苦瓜定与 8A 的单克隆抗体相偶联(此抗体可识别血浆细胞相关抗原)。偶联产物对带有 8A 相关抗原的 U₂₆₆和 Ruji 细胞系的毒害作用是苦瓜定单独作用的 1000 倍。此外,这种免疫毒素还可作用于赘生性浆细胞,而髓样前体由于不含 8A 相关抗原则可抵抗它的作用。在多发性骨髓瘤病人中,此免疫毒素可用于自体骨髓移植的体外清理。Battelli^[10]报道,将苦瓜定与牛的 IgG 相偶联成免疫毒素后作用于小鼠体内,发现在致死剂量作用下,对小鼠主要的损伤来自于严重的肝坏死,偶联产物抑制核糖体失活的作用比单一的苦瓜定作用强得多。Leamon^[11]将苦瓜定与叶酸相连接后,经叶酸受体介导的内吞作用,可使苦瓜定-叶酸结合物进入到培养的 HeLa 和 KB 细胞中,并发现此结合物对蛋白质的合成具有强烈的抑制作用,抑制浓度为 10^{-9} mol/L,远远高于非结合的苦瓜定,此抑制作用依赖于作用时间和浓度的大小。由此可见,当将苦瓜定与被作用细胞的识别物质偶联后,它将定位作用于靶细胞而对其它细胞伤害较小,这必将为它的应用开辟更为广阔的前景。

4 与其它苦瓜蛋白的相关性

Yeung^[12]认为 RIP 与 α -苦瓜素和 β -苦瓜素^[13]在本质上是同一的,苦瓜素和 RIP 都能分别与对方相应的抗血清发生免疫交叉反应。苦瓜素在一定浓度下也有抑制无细胞系统蛋白质合成的作用。Battelli^[14]认为某些植物蛋白的堕胎作用是与它们具有使核糖体失活的特性有关。研究了苦瓜定对人类滋养层细胞,人类胚胎成纤维细胞,人绒毛膜癌细胞

(JAR 和 Rewo)以及人卵巢癌细胞(TG)的作用后发现,人类滋养层细胞和 Rewo 细胞系中蛋白质合成受到的抑制作用较强,必将诱导堕胎作用。Shao^[15]亦报道,苦瓜素与苦瓜 RIP 的作用相似,均能抑制蛋白质合成。苦瓜素与苦瓜 RIP 之间的确切关系以及它们各自的作用机制,仍有待于进一步研究。

以上从四个方面总结了关于苦瓜 RIP 的研究报道,它的抑制肿瘤细胞蛋白质合成进而抑制肿瘤细胞生长的作用越来越受到重视,可是作用方式的无选择性使其临床应用受到一定限制。目前如何降低或减缓 RIP 的毒性以便更好地用于肿瘤的治疗已成为研究目标。随着研究和开发的不断深入,相信苦瓜 RIP 的应用前景还是很可观的。

参考文献

- 1 Barbieri L, et al. *Biochem J*, 1980, 186(2): 443
- 2 郑 硕, 等. *生物化学杂志*, 1992, 8(4): 429
- 3 Minami Y, et al. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1992, 56(9): 1470
- 4 Kimura Y, et al. *Agric Biol Chem*, 1991, 55(8): 2031
- 5 Minami Y, et al. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1993, 57(7): 1141
- 6 Endo, et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, 150(3): 1032
- 7 Brigotti M, et al. *Biochem J*, 1991, 277(1): 281
- 8 Stirpe F, et al. *Brit J Cancer*, 1988, 58(5): 558
- 9 Dinota A, et al. *Brit J Cancer*, 1989, 60(3): 315
- 10 Battelli, et al. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*, 1990, 98(7): 585
- 11 Leamon C P, et al. *J Biol Chem*, 1992, 267(35): 24966
- 12 Yeung H W, et al. *Int J Reptide Protein Res*, 1988, 31(3): 265
- 13 王庆华, 等. *中草药*, 1995, 26(5): 266
- 14 Battelli, et al. *Exp Cell Research*, 1992, 201(1): 109
- 15 Shaw PC, et al. *Targeted Diagn Ther*, 1992, 7(2): 213

(1995-10-22 收稿)

欢迎订阅 1997 年《中草药》杂志

欢迎刊登仪器设备等产品广告

联系人: 刘明升 黄永谦