

- sus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ[J]. Am J Obstet Gynecol, 2007, 197(4): 340-345.
- [12] Paraskevaidis E, Arbyn M, Sotiriadis A, et al. The role of HPV DNA testing in the follow-up period after treatment for CIN: a systematic review of the literature[J]. Cancer Treat Rev, 2004, 30(2): 205-211.
- [13] Arbyn M, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch P, et al. Clinical utility of HPV-DNA detection; triage of minor cervical lesions, follow-up of women treated for high-grade CIN: an update of pooled evidence[J]. Gynecol Oncol, 2005, 99(3 Suppl 1): S7-11.
- [14] Venturoli S, Ambretti S, Cricca M, et al. Correlation of high-risk human papillomavirus genotypes persistence and risk of residual or recurrent cervical disease after surgical treatment[J]. J Med Virol, 2008, 80(8): 1434-1440.
- [15] Kang WD, Oh MJ, Kim SM, et al. Significance of human papillomavirus genotyping with high-grade cervical intraepithelial neoplasia treated by a loop electrosurgical excision procedure[J]. Am J Obstet Gynecol, 2010, 203(1): e71-76.
- [16] Wu D, Zheng Y, Chen W, et al. Prediction of residual/recurrent disease by HPV genotype after loop excision procedure for high-grade cervical intraepithelial neoplasia with negative margins[J]. Aust N Z J Obstet Gynaecol, 2011, 51(2): 114-118.
- [17] Wheeler CM, Hunt WC, Joste NE, et al. Human papillomavirus genotype distributions; implications for vaccination and cancer screening in the United States[J]. J Natl Cancer Inst, 2009, 101(7): 475-487.
- [18] Chen W, Zhang X, Molijn A, et al. Human papillomavirus type-distribution in cervical cancer in China; the importance of HPV 16 and 18 [J]. Cancer Causes Control, 2009, 20(9): 1705-1713.
- [19] Dai Y, Huang YS, Tang M, et al. Distribution and clinical significance of human papillomavirus subtypes in Shenzhen city, People's Republic of China [J]. Int J Gynecol Cancer, 2008, 18(2): 295-299.
- [20] Smith JS, Lindsay L, Hoots B, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update [J]. Int J Cancer, 2007, 121(3): 621-632.
- [21] Bao YP, Li N, Smith JS, et al. Human papillomavirus type distribution in women from Asia; a meta-analysis [J]. Int J Gynecol Cancer, 2008, 18(1): 71-79.
- [22] Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, et al. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia; a randomised controlled trial [J]. Lancet Oncol, 2010, 11(3): 249-257.
- [23] Naucler P, Ryd W, Tornberg S, et al. Efficacy of HPV DNA testing with cytology triage and/or repeat HPV DNA testing in primary cervical cancer screening [J]. J Natl Cancer Inst, 2009, 101(2): 88-99.
- [24] Shi JF, Belinson JL, Zhao FH, et al. Human Papillomavirus testing for cervical cancer screening: results from a 6-year prospective study in rural china [J]. Am J Epidemiol, 2009, 170(6): 708-716.

(收稿日期: 2012-06-09 修回日期: 2012-08-22)

• 综 述 •

核糖体失活蛋白及其在生物医学领域的应用与研究进展*

赵 婷¹, 姚大卫², 吴志斌², 左雨鹏², 邝咏衡², 谢天顺¹, 冯先玲¹综述, 沙 鸥^{1△}, 张 健^{1▲}

(1. 深圳大学医学院基础医学系, 广东深圳 518060; 2. 香港中文大学医学院生物医学科学学院, 香港 999077)

关键词: 核糖体失活蛋白; N-糖苷酶; 免疫毒素; 细胞因子; 逆向运输

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-8348. 2012. 34. 040

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)34-3663-03

核糖体失活蛋白 (ribosome-inactivating proteins, RIPs) 是一类具有特殊生物毒性的蛋白。它具有 N-糖苷酶活性, 可以灭活真核细胞的核糖体, 使其蛋白质的生成受阻, 从而导致细胞死亡^[1]。具体来说, RIPs 因其具有 N-糖苷酶活性, 能够作用于真核生物 28S 核糖体 RNA 大亚基上的茎环结构顶部 GA4324GA 的普遍保守的 S/R 区域, 通过脱嘌呤作用, 阻滞了延长因子 EF-2 与核糖体的结合, 使细胞内核糖体失活, 从而不可逆地抑制蛋白质合成^[2], 进而引发细胞凋亡或坏死。RIPs 还具有 RNA 水解酶活性, 可以裂解 28S RNA 的第 4 325

与 4 326 位核苷酸之间的磷酸二酯键^[3-4]。

RIPs 的发现距今已有一百多年的历史, 它是植物产生的一种具有防御和保护自我功能的蛋白质^[5-7]。RIPs 可存在于植物的各个部位, 以种子中的含量最高^[8], 并且, 不同植物种子中 RIPs 含量也不同。目前, 也有人在某些真菌 (如蘑菇)、藻类和细菌 (如志贺毒素) 中发现 RIPs^[9-11], 它们可以抑制蛋白质合成, 但作用机制和植物 RIPs 并不是完全相同^[12]。起初发现它们具有共同的 RIPs 毒性机制, 可以抑制真核细胞核糖体蛋白质生物合成, 随后发现它们还具有抗病毒、抗细菌、抗增殖、抗

* 基金项目国家自然科学基金面上项目 (81171154); 深圳市基础研究计划资助项目 (JCYJ20120613113228732)。△ 通讯作者, Tel: (0755)86671918; E-mail: shaou@szu.edu.cn。▲ 通讯作者, Tel: (0755)86671997; E-mail: jzhanghappy@yahoo.com.cn。

肿瘤、抗艾滋病病毒、抗孕及神经毒性等多方面的作用,因此,先后引起农业领域、生物及医学界的广泛关注。

1 核糖体失活蛋白的分类及其生物学活性

目前,依照 RIPs 结构的不同,可分为 3 类(或 3 型)^[13]:一型 RIPs 为单肽链碱性蛋白,相对分子质量为 30×10^3 左右,具有 RNA N-糖苷酶活性。包凌等^[14]研究发现,一型 RIPs 一级结构有很高的同源性,二级结构有较多的 α -螺旋和 β -折叠,它们具有相似的生物学活性。科研人员还从一些葫芦的种子中分离提纯出一些相对分子质量为 10×10^3 甚至更小的 RIPs,它们的特点是含有丰富的精氨酸、谷氨酸或谷氨酰胺残基^[15]。一型 RIPs 的单链即为具有灭活核糖体功能的活性链,具有 N-糖苷酶活性,它与细胞膜上磷脂相互作用,通过受体介导的内吞作用进入细胞,但内化效率不高,因此,细胞毒性较小。此外这类 RIPs 进入细胞的机制还涉及受体非依赖性机制^[16]。

二型 RIPs 为异源二聚体酸性蛋白,分为 A、B 两条肽链,通过二硫键相连,并具有强烈的疏水作用,相对分子质量为 60×10^3 左右。A 链与一型 RIPs 相似,具有 RNA N-糖苷酶活性;B 链对半乳糖结构具有特定的凝集素活性,能与细胞表面的糖基相互作用,从而帮助 A 链进入细胞发挥毒性功能。还有一些二型 RIPs 由 4 条多肽链组成,实际上是由两个相同的双链 RIPs 分子通过次级键结合在一起的二聚体,其性质与双链 RIPs 相同,但毒性相差甚远。最新研究发现,B 链除了诱导凋亡或坏死的作用外,还具有诱导破骨细胞分化的功能。这项研究成果,为破骨细胞分化的调节和骨骼免疫学的研究提供了新的方向^[17]。

三型 RIPs 比较少见,也是一类单链蛋白,包括一个与一型 RIPs 相似的 N 端区域和一个未知功能的 C 端区域^[18]。其先通过合成无活性的前体,然后在涉及形成活性位点的氨基酸之间进行酶解加工才形成成熟 RIPs^[19]。三型 RIPs 合成时以无活性的蛋白前体形式存在,当活性位点氨基酸中间的二硫键以及 C 末端和 N 末端的扩展序列被水解之后,三型核糖体才有活性。

2 RIPs 的应用

2.1 抗孕 一型 RIPs 中的中药天花粉蛋白(TCS),是传统中医认可的堕胎药。研究发现,TCS 是通过杀死绒毛滋养层细胞使胎儿致死。绒毛滋养层细胞对 TCS 非常敏感,实验发现绒毛滋养层细胞摄入大量的 TCS 分子后,导致绒毛广泛变性坏死,纤维素沉着,绒毛间隙闭塞及血循环受到阻断,血循环的阻断又加速绒毛的变性坏死,促使前列腺素释放而流产。

2.2 抗肿瘤 早在 1970 年,Lin 等^[20]就已研究发现蓖麻毒素 ricin 和相思子毒素 abrin 对小鼠腹水瘤、Yoshida 肉瘤、实验性白血病、B₁₆ 黑色素瘤有治疗作用。通过临床观察及实验室证明,TCS 可直接作用于绒毛滋养层细胞,使之变性坏死并可提高机体的免疫功能,从而提出 TCS 可作为治疗恶性滋养层肿瘤的选用药物之一。有研究结果表明,TCS 对 T 淋巴细胞和巨噬细胞衍生的细胞株的杀伤作用主要是通过诱导细胞凋亡实现的,提示 TCS 的抗肿瘤细胞作用与细胞类型相关的,并且针对不同类型的细胞有其不同的机制。最近有研究显示,分离纯化的蓖麻种子毒蛋白,是具有杀死食管癌细胞的一类 RIPs,是稳定剂型的蛋白质药物。

但由于 RIPs 具有很强的免疫原性,可诱导产生破坏性抗体 IgG 和 IgE,产生一些如过敏反应、神经和肾脏毒性等不良

反应,限制了临床应用。后来,免疫毒素的成功研制,为在临床的应用开辟了新的领域,也成为现在医学界的研究热点。免疫毒素是抗体与毒素的偶联物,能更好地提高毒素作用的靶向性,从而更有效地发挥毒素的杀伤效应。其对肿瘤细胞的活性比游离毒素强,一般具有更高的疗效和更低的毒性。

2.3 神经科学方面的研究成果及应用 1982 年,首先报道于远端迷走神经和舌下神经内注射蓖麻毒素,该毒素沿神经向神经元细胞传输,使核糖体失活,不可逆地抑制蛋白质合成,导致神经死亡。这种毒素逆向轴浆运输的作用,造成神经系统的选择性损伤,称为“自杀性传输”。它们还可以结合单克隆抗体,治成免疫毒素,对特异性的神经元有选择性的杀伤作用,并被命名为“分子神经外科”。随后发现多种 RIPs 都具有类似神经毒性,如相思子毒素、莨菪根毒素等。一个细胞里大约有 10% 的核糖体失活,就可以杀死这个细胞。自杀性运输这种方法多用于实验用途,如决定神经介质的细胞定位、研究在严格限制范围内神经元丢失后感觉传到通路和运动系统的可塑性变化、评估初级感觉神经元在自噬行为中的作用等。

由于二型 RIPs 如蓖麻毒素具有凝集素 B 链,其毒性大,对细胞的选择性小。而一型 RIPs 为单链活性链,其细胞毒性就受到了很大的限制。Sha 等^[21]对两个结构相似的单链 RIPs 中药天花粉蛋白 TCS 和蓖麻毒素 A 链 RTA 的神经毒性进行研究后提出,这两种单链 RIPs 对小鼠视网膜神经细胞都具有毒性,引起小鼠视网膜明显改变。不同的是,TCS 通过凋亡杀死特定部位的视网膜细胞(主要在外核层和内核层),而 RTA 引起视网膜发炎,导致细胞坏死。同时发现 RTA 的作用机制和二型 RIPs 中 RCA 的作用机制相同,说明二型 RIPs 的 B 链在神经毒性方面可能并不是很必要的。通过这个研究结果提示 RIPs 可以应用于视网膜模型的创立,TCS 可能可以用于视网膜母细胞瘤的化疗。

香港中文大学的研究人员还进行了对 TCS 周围性神经毒性的实验研究,发现 TCS 通过周围神经轴突逆向运输,在相应节段的脊髓前角运动神经元几乎全部死亡而相应节段的背根神经节的感觉神经元仅部分死亡,显示出 TCS 对感觉神经元具有选择性神经毒性。因此,TCS 可以用来诱导神经损害,可能可以用于治疗慢性痉挛、痛觉过敏和疼痛等的治疗。

2010 年,Sha 等^[22]进一步研究了 TCS 引起的视网膜神经毒性在细胞通路、神经胶质细胞反应等方面的机制。研究显示 TCS 主要通过线粒体退化途径来诱发凋亡,TCS 可以选择性地进入视网膜的穆勒胶质细胞和色素细胞,可以引起神经胶质细胞类型和数量的变化,随后导致光感细胞死亡。相反的,RTA 可以进入血管内皮细胞并破坏血管内皮,导致视网膜炎和坏死,更进一步地揭示了 TCS 对神经系统的毒性机制,提示笔者可以利用 RIPs 特异性地杀死某些神经,从而减轻这些神经带来的伤害,如顽固性头痛,从而为临床上难治性神经系统疾病的治疗提供了新的思路。

3 核糖体失活蛋白的检测

与一型 RIPs 相比,二型 RIPs 由于 B 链的凝集素活性,便于进入细胞,产生较强的细胞毒性,在人们的日常生活中,应提高对 RIPs 作为毒物的认识。如蓖麻毒素毒性极强,为有机磷神经毒素的 380 倍,氰化物的 6 000 倍。基于其潜在的威胁,如今已根据 RIPs 的理化性质和免疫学特性研制出多种快速、灵敏、准确的检测方法,主要包括免疫荧光技术、夹心免疫

PCR 技术、免疫胶体金标记技术、蛋白芯片技术和生物传感器技术等,用于检测 RIPs。有研究表明,纳米颗粒探针也能够用于蓖麻毒素等 RIPs 的检测,为人们的生命、生活及食品卫生安全提供多方面的保障。

此外,RIPs 的检测手段的应用并不局限于军事反恐、食品卫生方面。有学者发明了应用酶联免疫吸附法测定麻风树核糖体失活蛋白的方法,为麻风树的综合利用提供了技术支持。从而在资源紧缺的今天,使大家可以综合利用资源,最大可能地少浪费。

4 展 望

综上所述,RIPs 来源广,易获得。在生物医学界具有抗增殖、抗肿瘤、抗病毒、抗孕、免疫调节及神经系统毒性作用,具有重要的理论和应用价值。RIPs 抗孕、抗肿瘤方面作用,结合更多、更高效的免疫毒素的研制,将会给人类带来意想不到的收获。使人们在进行药物流产时更安全、更有针对性、效果更好,不良反应更小。RIPs 在神经系统方面的特性,给神经科学研究提供了更好的研究手段。TCS 的选择性神经毒性作用有望在难治性神经系统疾病方面得到应用。

参考文献:

[1] Endo Y, Tsurugi K. RNA N-glycosidase activity of ricin A chain; mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes[J]. *J Biol Chem*, 1987, 262(17): 8128-8130.

[2] Moazed D, Robertson JM, Noller HF. Interaction of elongation factors EF-G and EF-Tu with a conserved loop in 23S rRNA[J]. *Nature*, 1988, 334(6180): 362-364.

[3] Perentesis JP, Miller SP, Bodley JW. Protein toxin inhibitors of protein synthesis[J]. *Biofactors*, 1992, 3(3): 173-184.

[4] Hartley MR, Lord JM. Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1701(1/2): 1-14.

[5] Nielsen K, Boston RS. Ribosome-inactivating proteins: a plant perspective[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2001, 52: 785-816.

[6] Peumans WJ, Hao Q, van Damme EJ. Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases[J]. *FASEB J*, 2001, 15(9): 1493-1506.

[7] Hartley MR, Lord JM. Cytotoxic ribosome inactivating lectins from plants[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1701(1/2): 1-14.

[8] 黄如葵, 罗海玲, 黄玉辉, 等. 不同基因型苦瓜种子发育过程中核糖体失活蛋白的累积变化[J]. *南方农业学报*, 2011, 42(3): 236-239.

[9] Lam SK, Ng TB. First simultaneous isolation of a ribosome inactivating protein and an antifungal protein from

a mushroom (*Lycophotia lum shimeji*) together with evidence for synergism of their antifungal effects [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2001, 393(2): 271-280.

- [10] Liu RS, Yang JH, Liu WY. Isolation and enzymatic characterization of lamjapin, the first ribosome inactivating protein from *Cryptogamic gal plant* [J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269(19): 4746-4752.
- [11] Tesh VL. Activation of cell stress response pathways by shiga toxins [J]. *Cell Microbiol*, 2012, 14(1): 1-9.
- [12] 陈洪章, 邹全明. 肠出血性大肠杆菌 (EHEC) 0157: H7 志贺毒素研究进展 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2007, 23(1): 83-85.
- [13] 郝勇峰, 徐雅琴, 王丽波. 核糖体失活蛋白及其研究进展 [C]. *生命科学*, 2011, 23(10): 951-956.
- [14] 包凌, 吴民沪, 聂宇, 等. 苦瓜籽核糖体失活蛋白的基本性质研究 [J]. *四川大学学报*, 2009, 46(4): 1203-1206.
- [15] Ng1 TB, Wong JH, Wang H. Recent progress in research on ribosome inactivating proteins [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2010, 11(1): 37-53.
- [16] Xia XF, Zhang F, Shaw PC, et al. Trichosanthin induces leakage and membrane fusion of liposome [J]. *IUBMB Life*, 2003, 55(12): 681-687.
- [17] Wang YM, Lu TL, Hsu PN, et al. Ribosome inactivating protein B-chain induces osteoclast differentiation from monocyte/macrophage lineage precursor cells [J]. *Bone*, 2011, 48(66): 1336-1345.
- [18] 安冉, 孙素荣. 核糖体失活蛋白在生物医学方面的应用研究进展 [J]. *疾病预防控制通报*, 2011, 26(4): 87-89.
- [19] Nielsen K, Boston RS. Ribosome inactivating proteins: a plant perspective [J]. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2001, 52: 785-816.
- [20] Lin JY, Tserng KY, Chen CC, et al. Abrin and ricin: new antitumour substances [J]. *Nature*, 1970, 227(5255): 292-293.
- [21] Sha O, Kwong WH, Pang Cho EY, et al. Different neuronal toxicity of single-chain ribosome-inactivating proteins on the rat retina [J]. *Toxicol*, 2008, 51(1): 45-53.
- [22] Shen WZ, Sha O, Yew DT, et al. Retrograde transport of a traditional chinese medicine, alpha-trichosanthin, and its selective neural toxicity [J]. *Clin Toxicol (Phila)*, 2009, 47(9): 876-883.
- [23] Sha O, Yew DT, Cho EY, et al. Mechanism of the specific neuronal toxicity of a type I ribosome-inactivating protein [J]. *Neurotox Res*, 2010, 18(2): 161-172.

(收稿日期: 2012-06-09 修回日期: 2012-08-22)