

香樟树种子中两种 II 型核糖体失活蛋白 凝集素活性的研究*

杨海燕^{1,2)} 李荣秀^{2,3)}** 刘望夷¹⁾**

(¹⁾中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031;

²⁾中国科学院上海生命科学研究院生物工程研究中心, 上海 200233; ³⁾上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200030)

摘要 从香樟树成熟的种子分离到两种新的 II 型核糖体失活蛋白: 新丰毒蛋白和辛纳毒蛋白. 两者 A 链的分子质量虽然相差近一倍, 但 B 链的分子质量相同. II 型核糖体失活蛋白的 A 链是 RNA N-糖苷酶, B 链是凝集素, A 链进入细胞表现毒性在很大程度上依赖于 B 链的糖结合活性和特异性. 对辛纳毒蛋白和新丰毒蛋白 B 链的凝集素活性进行了测定和比较. 红细胞凝集实验显示辛纳毒蛋白和新丰毒蛋白具有相同的细胞凝集活性, 半抗原抑制实验发现它们都属于半乳糖型核糖体失活蛋白, 荧光光谱法显示它们的糖结合常数也相同.

关键词 新丰毒蛋白, 辛纳毒蛋白, 凝集素, 荧光光谱法

学科分类号 Q51

II 型核糖体失活蛋白 (ribosome-inactivating protein, RIP) 由 RNA N-糖苷酶活性的 A 链和凝集素活性的 B 链构成. II 型 RIP 细胞毒性较强, 使其在肿瘤、艾滋病治疗等方面具有应用价值, 成为新的研究热点. II 型 RIP 的细胞毒性在很大程度上依赖于 B 链的糖结合活性和特异性. 根据 B 链的糖结合特异性, II 型核糖体失活蛋白分为半乳糖或半乳糖/N-乙酰半乳糖胺型, 神经酰胺半乳糖型和半乳糖/甘露糖苷型 3 种类型^[1].

辛纳毒蛋白是本实验室从香樟树 (*Cinnamomum camphora*) 成熟种子中提纯的一种新的 II 型 RIP^[2]. 我们对它的基因结构、表达方式、细胞毒性、生理学功能、A 链的 RNA-N 糖苷酶活性及 B 链的糖链结构等都进行了较深入的研究^[3,4], 但对其 B 链的凝集素活性所知甚少. 最近, 我们从香樟树成熟的种子中又发现了一种新的 II 型 RIP: 新丰毒蛋白. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳揭示, 新丰毒蛋白 A 链比辛纳毒蛋白 A 链的分子质量小约一半, 分别约为 16 ku 和 31 ku, 但两者 B 链分子质量均为 33 ku. 研究结果还发现, 新丰毒蛋白和辛纳毒蛋白的 A 链以及两者 B 链的 N 端 10 个氨基酸分别相同^[5]. 本文测定和比较了香樟树种子中这两个 II 型核糖体失活蛋白 B 链的细胞凝集活性、糖结合特异性和糖结合活性, 并与蓖麻毒蛋白 D (ricin D) 的凝集素活性进行了比较, 提出了辛纳毒蛋白与蓖麻毒蛋白细胞毒性差异显著的可能原因.

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

香樟树 (*Cinnamomum camphora*) 成熟的种子采集于上海植物园. 新西兰大耳兔购自中国科学院上海实验动物中心. 甲叉丙烯酰胺和巯基乙醇 (Fluka 公司). N-乙酰半乳糖胺和 6'-神经酰胺乳糖 (Sigma 公司). 柱层析所用介质 Sepharose 4B, Phenyl Sepharose CL-4B, 羟基磷灰石, Superose 12 预装柱以及快速蛋白质液相层析仪 FPLC ÄKTA explorer (Pharmacia 公司). V 型微滴定板 (Sangon 公司). 荧光光谱仪 (Hitachi 650-10S).

1.2 新丰毒蛋白和辛纳毒蛋白的制备

按照 Li 等^[6]的方法从香樟树成熟的种子中制备新丰毒蛋白和辛纳毒蛋白的粗提液. 粗提液进行 Phenyl Sepharose CL-4B 柱疏水层析. 上样缓冲液为含 0.5 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0). 用含 0.2 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液洗脱, 洗脱下的蛋白质为高纯度的辛纳毒蛋白, 再用蒸馏水进一步洗脱, 收集的洗脱峰进行羟基磷灰石柱层析,

* 中国科学院基金 (KSCX2-2-04) 和国家自然科学基金资助项目 (39870186).

** 通讯联系人.

Tel: ¹⁾021-54921238, ³⁾021-62933272

Fax: ¹⁾021-54921011, ³⁾021-64830490

E-mail: ¹⁾wyliu@sibs.ac.cn, ³⁾rxli@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2004-02-02, 接受日期: 2004-04-06

用 0 ~ 170 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 6.8) 进行线性梯度洗脱, 收集第二个洗脱峰, 此样品经过分子筛柱 Superose 12 进一步纯化, 用含 0.15 mol/L NaCl 的 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液洗涤层析柱, 得到第二个洗脱峰中的样品即为新丰毒蛋白。纯化的蛋白质均经过对水透析, 冷冻干燥后保存于低温冰箱中备用。

1.3 II 型 RIP 红细胞凝集活性的测定

按照 Liener^[7] 的方法, 在 V 型微滴定板孔中加入 25 μ l 溶于磷酸缓冲溶液 (PBS) 的蛋白质, 在板上每行各孔中用 PBS 将蛋白质倍比稀释成不同浓度。以蓖麻毒蛋白 D 作为阳性对照, PBS 作为阴性对照检测红细胞凝集活性。按照 Lis 等^[8] 的方法制备红细胞, 然后按照 Turner 等^[9] 的方法交联红细胞。测定时将 10% 的交联红细胞贮存液用 PBS 稀释至 1%, 取 25 μ l 加至上述含有不同浓度蛋白质溶液的微滴定板各孔中, 混匀, 室温静置 2 h, 观察红细胞凝集现象。

1.4 II 型 RIP 与糖结合特异性的测定

糖和蛋白质分别溶于 PBS 溶液。按照 Beeley^[10] 的方法, 取 25 μ l 糖溶液在 V 型微滴定板每行各孔中作倍比稀释, 然后在每孔中加入 25 μ l 蛋白质溶液, 使蛋白质的最终浓度为引起红细胞半数凝集的浓度。混匀后, 室温静置 30 min。再向每孔中加入 1% 的交联红细胞 50 μ l, 混匀后, 室温静置 2 h, 观察红细胞凝集现象。

1.5 荧光光谱法测定 II 型 RIP 与糖的结合常数

用 Hitachi 650-10S 荧光光谱仪测定蛋白质荧光光谱的变化^[11]。测定参数: 激发波长 290 nm, 激发带宽 5 nm, 发射波长 300 ~ 400 nm, 发射带宽 10 nm, 扫描速度 120 nm/min。

2 结 果

2.1 3 种 II 型 RIPs 红细胞凝集活性的比较

蓖麻毒蛋白 D、辛纳毒蛋白和新丰毒蛋白引起红细胞凝集的最低浓度分别为 0.004 μ mol/L, 0.20 μ mol/L 和 0.22 μ mol/L (图 1)。结果显示, 辛纳毒蛋白和新丰毒蛋白的红细胞凝集活性相同, 但与蓖麻毒蛋白 D 的红细胞凝集活性相差甚远。

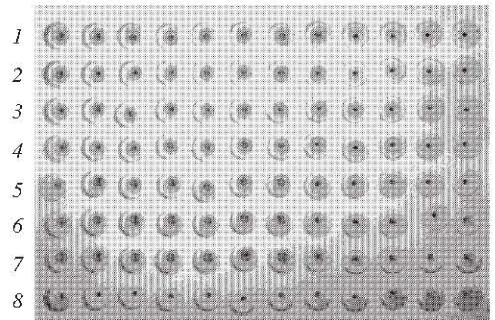


Fig. 1 Hemagglutination of three type II RIPs in the V-shape microtitre plate

1, 2: ricin D with initial concentration 0.07 g/L; 3, 4: cinnamomin with initial concentration of 1.7 g/L; 5, 6, 7: cinphorin with initial concentration of 1.3 g/L; 8: PBS control not containing proteins but red cells. The proteins were 2-fold serially diluted in PBS and mixed with 1% fixed red cells.

2.2 新丰毒蛋白和辛纳毒蛋白与糖结合的特异性

检测蛋白质与糖结合的特异性时, 选取半乳糖或半乳糖/N-乙酰半乳糖胺型 RIP 结合的半乳糖、乳糖和 N-乙酰半乳糖胺、神经酰胺半乳糖型 RIP 结合的 6'-神经酰胺乳糖 (6'-sialyllactose)、半乳糖/甘露糖苷型 RIP 结合的甘露糖和半乳糖这几种代表性的糖, 选取葡萄糖和蔗糖为阴性对照。如图 2 所示, 新丰毒蛋白和辛纳毒蛋白不属于半乳糖/甘

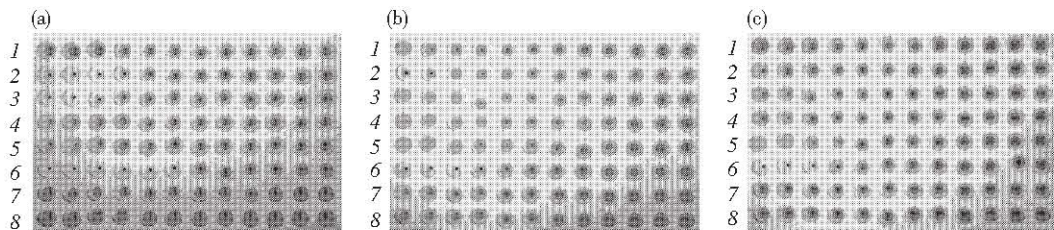


Fig. 2 Hapten inhibition of hemagglutination by ricin D (a), cinphorin (b) and cinnamomin (c)

The sugars used in the three assays were in the same order. 1: glucose; 2: galactose; 3: N-acetyl-galactosamine; 4: mannose; 5: sucrose; 6: lactose; 7: 6'-sialyllactose; 8: PBS control not containing sugars but proteins and 1% fixed red cells. The concentration of protein that caused half-hemagglutination was used. The initiative concentrations of sugars were 400 mmol/L. That is to say that the final concentration of the test sugar in each first line was 100 mmol/L, except that of 6'-sialyllactose, which is 1 mmol/L.

露糖苷型, 也不属于神经酰胺半乳糖型 (如果神经酰胺乳糖浓度达到 1 mmol/L 仍不能抑制 RIP 引起的细胞凝集, 则此种 RIP 不属于神经酰胺半乳糖型^[12]). 新丰毒蛋白和辛纳毒蛋白均为半乳糖型 RIP, 半乳糖对两者引起细胞凝集的最低抑制浓度均为 25 mmol/L, 乳糖为 6.25 mmol/L. 而蓖麻毒蛋白 D 除了与半乳糖和乳糖结合外, 还可与 N-乙酰半乳糖胺结合. 半乳糖、乳糖和 N-乙酰半乳糖胺对蓖麻毒蛋白 D 引起细胞凝集的最低抑制浓度分别是 6.25 mmol/L, 1.56 mmol/L 和 6.25 mmol/L. 可见, 蓖麻毒蛋白 D 属于半乳糖/N-乙酰半乳糖胺型 RIP, 并且它与这几种糖的结合能力均较新丰毒蛋白和辛纳毒蛋白高.

2.3 荧光光谱法测定 II 型 RIP 与糖的结合常数

II 型 RIP 与糖结合时, 引起 RIP 分子中糖结合位点附近色氨酸微环境的变化, 从而导致色氨酸荧光光谱发生变化. 用 290 nm 波长的光激发时, 辛纳毒蛋白的荧光光谱在 340 nm 产生最大的发射光谱 (图 3-1). 当加入 10 mmol/L 半乳糖时, 荧光光谱发生 2 nm 的蓝移 (图 3-2), 并且发生很明显的荧光淬灭现象. 如果加入一种不能与辛纳毒蛋白结合的糖如葡萄糖则不能产生这样的现象. 新丰毒蛋白用 290 nm 波长的光激发时也在 340 nm 产生最大的发射光谱, 而且结合半乳糖后的蓝移及荧光淬灭现象均与辛纳毒蛋白的图谱变化相似. 但是, 蓖麻毒蛋白 D 与前两种 RIP 不同, 在 320 nm 产生最大发射光谱, 与半乳糖结合后发生 3 nm 的蓝移, 且无明显的荧光淬灭现象^[13].

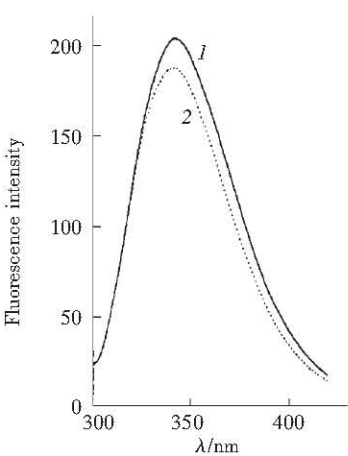


Fig. 3 Fluorescence spectra of cinnamomin in the absence and the presence of galactose

Spectra were measured in 5 mmol/L phosphate buffer (pH 7.4) containing 150 mmol/L NaCl at 20°C. The protein concentration was 3 μmol/L and the excitation wavelength was 290 nm. The spectra were measured in the absence of galactose (—) and the presence of 10 mmol/L galactose (----).

蛋白质的荧光强度随着结合的糖浓度增加而不断减少, 差值形成一条饱和曲线 (图 4 a). 从而可以根据糖浓度变化导致的荧光强度变化, 通过 Scatchard 作图计算出蛋白质与糖的结合常数, 斜率即为结合常数 Ka^F (mmol⁻¹ · L). 用这个方法测定出新丰毒蛋白和辛纳毒蛋白与半乳糖的结合常数分别为 4.66×10^3 mol⁻¹ · L 和 4.68×10^3 mol⁻¹ · L; 与乳糖的结合常数分别为 6.13×10^3 mol⁻¹ · L 和 6.10×10^3 mol⁻¹ · L. 另外, 测得蓖麻毒蛋白 D 与半乳糖和乳糖的结合常数分别为 4.98×10^3 mol⁻¹ · L 和 10.76×10^3 mol⁻¹ · L. 因此, 新丰毒蛋白和辛纳毒蛋白与糖的结合能力是相同的, 但都小于蓖麻毒蛋白 D 与糖的结合能力.

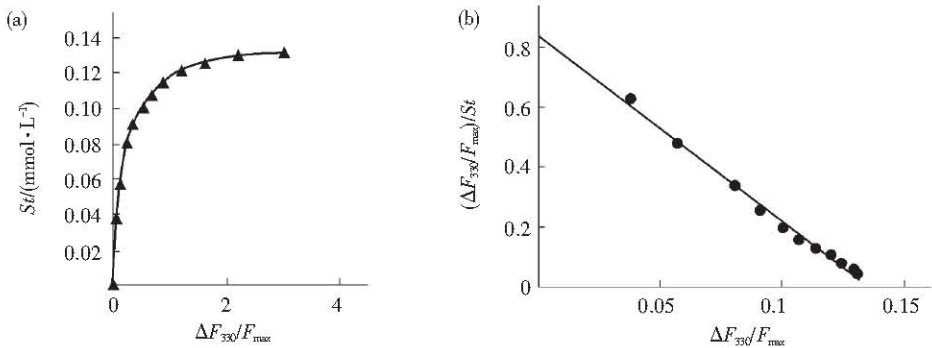


Fig. 4 Scatchard plot for lactose binding to cinphorin

Spectral measurements were done under the same conditions as cinnamomin as described in the legend to Figure 3 except that the saccharide concentration was varied. The variation of $\Delta F_{330}/F_{max}$ with saccharide concentration (St) is shown in Figure 4a. The equation for Scatchard plot is $y = -6.1331x + 0.8354$ ($r^2 = 0.99$) in (b). The slope of the plot is the binding constant, Ka^F (mmol⁻¹ · L).

3 讨 论

Ⅱ型 RIP 在细胞内表现毒性,即在细胞内的核糖体大亚基 RNA 上脱去一个腺嘌呤而抑制蛋白质合成,需要经过以下过程:与细胞识别,内吞,转运等.在这个过程中Ⅱ型 RIP 的 B 链与细胞表面的糖结合是蛋白质进入细胞表现毒性的一个重要前提.其他两种类型 RIP:Ⅰ型和Ⅲ型 RIP 由于没有 B 链凝集素结构,不能识别细胞表面的糖.它们虽然可以通过内吞等其他途径进入细胞,但进入细胞的几率很低,从而不表现细胞毒性或细胞毒性极低^[1].因此,B 链的凝集素活性是研究Ⅱ型核糖体失活蛋白功能的重要内容.蓖麻毒蛋白 D 与辛纳毒蛋白的 A 链体外 RNA N-糖苷酶活性基本相同^[2],但蓖麻毒蛋白 D 的细胞毒性比辛纳毒蛋白高两个数量级,本文检测到它们的细胞凝集活性也相差约两个数量级,所以推测细胞毒性的差异是由它们 B 链的凝集素活性不同而造成的.

新丰毒蛋白和辛纳毒蛋白不仅具有相同的红细胞凝集活性,它们的糖结合特异性也相同.用蓖麻毒蛋白 D 作为对照,不仅证明了本文方法的可靠性,也表明蓖麻毒蛋白 D 与半乳糖或乳糖的结合能力更强.另外,蓖麻毒蛋白 D 又可以与 N-乙酰半乳糖胺结合,使得它与细胞表面上的糖结合时,多了一类亲和位点,所以蓖麻毒蛋白的细胞凝集活性更强.实验结果还说明,二糖(乳糖)对这三种Ⅱ型 RIP 所引起细胞凝集的抑制效果比单糖(半乳糖)更明显,即双糖更容易与Ⅱ型 RIP 结合.测定结果也证明Ⅱ型 RIP 与双糖的结合常数更高.

新丰毒蛋白和辛纳毒蛋白是存在于香樟树成熟种子中的两种Ⅱ型核糖体失活蛋白.它们具有分子质量相同,N 端序列相同的 B 链.本文发现,这两种毒蛋白 B 链的凝集素活性也完全相同.但新丰毒蛋白和辛纳毒蛋白的 A 链分子质量相差悬殊.这些现象在已知的Ⅱ型核糖体失活蛋白中从未报告过.因此,进一步研究两者的关系和它们在体内的生理

意义是一个非常重要的课题.

参 考 文 献

- 1 van Damme E J M, Hao Q, Peumans W J, *et al.* Ribosome-inactivating proteins: a family of plant proteins that do more than inactivate ribosomes. *Crit Rev Plant Sci*, 2001, **20** (5): 395 ~ 465
- 2 Ling J, Liu W Y, Wang T P. Simultaneous existence of two types of ribosome-inactivating proteins in the seeds of *Cinnamomum camphora* —— characterization of the enzymatic activities of these cytotoxic proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1252** (1): 15 ~ 22
- 3 He W J, Liu W Y. Cinnamomin, a multifunctional type II ribosome-inactivating protein. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003, **35** (7): 1021 ~ 1027
- 4 Pu Z, Liu W Y. Ribotoxins and their applications in probing the topographical structure of ribosomes. *J Nat Toxins*, 1999, **8** (3): 395 ~ 394
- 5 侯法健, 刘仁水, 刘望夷. 新丰毒蛋白——一种新的具有活性小 A 链的核糖体失活蛋白. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (4): 531 ~ 532
- 6 Hou F J, Liu R S, Liu W Y. *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (4): 531 ~ 532
- 7 Li X D, Chen W F, Liu W Y, *et al.* Large-scale preparation of two new ribosome-inactivating proteins-cinnamomin and camphorin from the seeds of *Cinnamomum camphora*. *Protein Expr Purif*, 1997, **10** (1): 27 ~ 31
- 7 Liener I E. The photometric determination of the hemagglutinating activity of soyin and crude soybean extracts. *Arch Biochem*, 1955, **54** (1): 223 ~ 231
- 8 Lis H, Sharon N. Soy bean (glycine max) agglutinin. *Method Enzymol*, 1920, **18**: 360 ~ 368
- 9 Turner R H, Liener I E. The use of glutaraldehyde-treated erythrocytes for assaying the agglutinating activity of lectins. *Anal Biochem*, 1975, **68** (2): 651 ~ 653
- 10 Beeley J G. The Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. In: Gottschalk A, ed. *Glycoprotein and Proteinglycan*. 16th. Amsterdam: Elsevier Press, 1985. 301 ~ 364
- 11 Privat J P, Delmotte R, Monsigny M, *et al.* Fluorescence studies of saccharide binding to wheat-germ agglutinin (lectin). *Eur J Biochem*, 1974, **47** (1): 5 ~ 14
- 12 Van Damme E J M, Barre A, Peumans W J, *et al.* The NeuAc (α -(2, 6)-Gal/GalNAc-binding lectin from elderberry (*Sambucus nigra*) bark, a type-2 ribosome-inactivation protein with an unusual specificity and structure. *Eur J Biochem*, 1996, **235** (1 ~ 2): 128 ~ 137
- 13 Hatakeyama T, Yamasaki N, Funatsu G. Evidence for involvement of tryptophan residue in the low-affinity saccharide binding site of ricin D. *J Biochem*, 1986, **99** (4): 1049 ~ 1056

Studies on Lectin Activity of Two Type II Ribosome-inactivating Proteins Isolated From Mature Seed of Camphor Tree *

YANG Hai-Yan^{1, 2)}, LI Rong-Xiu^{2, 3)} **, LIU Wang-Yi¹⁾ **

(¹⁾ State Key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;

²⁾ Shanghai Research Center of Biotechnology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233, China;

³⁾ School of Life Science & Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China)

Abstract Two new type II ribosome-inactivating proteins (RIPs) were isolated from the mature seed of camphor tree (*Cinnamomum camphora*). They are named cinnamomin and cinphorin. The molecular mass of cinphorin A-chain is only half of cinnamomin A-chain, while their B-chains are the same. Their A-chains are RNA N-glycosidases, and the B-chains are lectins. The intrinsic cytotoxicity of type II RIP is greatly dependent on the carbohydrate-binding activity and the specificity of its B-chain. The lectin activity of cinnamomin and cinphorin are investigated and compared with each other. They showed similar hemagglutination activity. Their saccharide binding specificities were studied by hapten inhibition, indicating that they were both galactose-specific. However, N-acetylgalactosamine failed to bind to the two RIPs as ricin/abrin did. The interactions of the two RIPs with specific saccharides were also investigated by fluorescence spectroscopy through which association constants were obtained. Their association constants of galactose or lactose were found to be identical.

Key words cinnamomin, cinphorin, lectin, fluorescence spectrometry

* This work was supported by grants from The Chinese Academia Sinica Fund (KSCX2-2-04) and The National Natural Sciences Foundation of China (39870186).

** Corresponding author. Tel: ¹⁾86-21-54921238, ³⁾86-21-62933272, Fax: ¹⁾86-21-54921011, ³⁾86-21-64830490

E-mail: ¹⁾wyliu@sibs.ac.cn, ³⁾rxli@sjtu.edu.cn

Received: February 2, 2004 Accepted: April 6, 2004