

文章编号: 1004-0374(2011)06-0533-08

植物凝集素的功能

鲍锦库*

(四川大学生命科学学院, 成都 610064)

摘要: 植物凝集素是来源于植物的一类能凝集细胞和沉淀单糖或多糖复合物的非免疫来源的非酶蛋白质。由于其对于单糖或糖复合物特异性结合的能力, 使得其在如信号转导、免疫反应、植物防御等诸多信号过程中均具有重要作用。同时植物凝集素具有细胞凝集、抗病毒、抗真菌及诱导细胞凋亡或自噬等多种能力, 因此在生命科学、医学及农业方面均有较好的研究价值和应用前景。综述了植物凝集素的研究历史和凝集素的主要功能, 并对现阶段凝集素的重点应用做简要介绍。

关键词: 植物凝集素; 糖结合活性; 抗肿瘤活性; 抗病毒活性; 植物凝集素应用

中图分类号: Q946.1 **文献标志码:** A

Plant lectins: multifunctions and applications

BAO Jin-Ku*

(School of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: Plant lectins are carbohydrate-binding proteins with nonimmune origin, and they could bind carbohydrates reversibly, agglutinate cells or precipitate polysaccharides and glycoconjugates. Due to the specific binding activities towards polysaccharides and glycoconjugates of plant lectins, they play important roles in signaling pathways, immunoregulation and plant defence. In addition, plant lectins also possess hemagglutinating and carbohydrate-binding activities as well as the anti-viral and apoptosis-inducing properties. Therefore, plant lectins have been drawn a rising attention for researchers in bioscience, medicine and agriculture. In this review, we summarize the history and multifunctions of plant lectins, and also present the applications of plant lectins.

Key words: plant lectin; carbohydrate-binding activity; anti-tumor activity; anti-viral activity; plant lectin application

1 研究背景

凝集素是一类能与细胞表面特殊糖蛋白、糖脂的寡糖结构结合的天然蛋白, 他们的存在调节着许多的生物学过程^[1-2]。随着凝集素家族成员的增加以及功能研究的不断深入, 原先凝集素的定义需加以重新修正。1979年在西德举行的第五次复合糖会议上, 修改了凝集素的定义。1980年, *Nature* 杂志发表了5位凝集素研究方面著名科学家的联名信, 提出了当时较有权威性的凝集素定义: 凝集素是指非免疫来源的糖结合蛋白或糖蛋白, 并应有使细胞凝集或糖复合物沉淀的能力。此定义包含三个要点: (1) 凝集素是蛋白质或糖蛋白; (2) 凝集素必须有专

一的与糖基结合的特性, 但是排除了免疫来源的针对糖基的抗体; (3) 因为规定了能使细胞凝集或是糖复合物沉淀的特性, 所以凝集素分子必须具有两个或更多糖结合位点, 这样把一些虽有糖结合能力但是糖结合位点仅有一个的酶、转运蛋白、激素、毒素等排除在外。凝集素可以识别糖蛋白和糖脂中复杂的碳水化合物结构, 也识别细胞膜表面的糖基, 因此, 凝集素可以作为研究细胞膜结构的有

收稿日期: 2011-01-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(30670469; 30970643)

通信作者: E-mail: jinkubao@yahoo.com

利工具。此外,凝集素由于具有多价结合能力,能与荧光素、酶、生物素、铁蛋白及胶体金等结合而不影响其生物活性,因此,凝集素也可用于免疫细胞化学的研究,以及肿瘤的诊断评价等。凝集素蛋白至少包含一个可以结合碳水化合物结构域,基于此,凝集素可以被分成主要的四类,部分凝集素(merolectins)、全凝集素(hololectins)、超凝集素(superlectin)以及嵌合凝集素(chimerolectins)^[3]。

植物凝集素的研究始于1888年, Herman Stillmark 偶然间观察到蓖麻籽的蛋白提取物能够凝集红细胞,并首次对凝集素进行了描述,这种凝集素由于具有很强的细胞毒性,因此后来被称为蓖麻毒素(Ricin)^[4]。紧接着,在同一大学的 H. Hellin 证明在相思豆的提取液中也有毒性凝集素的存在,这种凝集素称为 Abrin。Ricin 和 Abrin 很快被 Frankfurt 的实验治疗皇家研究院的 Paul Ehrlich 应用为免疫学研究的模式抗原而变得很有商业价值。植物凝集素常常被认为是一类不同于其他凝集素的蛋白,不同的植物凝集素拥有不同的生物化学性质、分子结构、碳水化合物的结合特异性以及生物学活性^[5]。现已知植物凝集素的分类方法有多种,其中一种分类方法主要基于碳水化合物结合特异性来分类,将植物凝集素分为 D-甘露糖或 D-葡萄糖凝集素、N-乙酰氨基半乳糖凝集素、D-半乳糖凝集素、N-乙酰氨基葡萄糖凝集素、L-岩藻糖凝集素以及 N-乙酰神经氨酸(唾液酸)凝集素。通过碳水化合物结合特异性对凝集素进行分类,强调了植物凝集素广泛地作为一种研究细胞膜结构的工具的作用。另外一种更加复杂的分类方法主要是依据凝集素的序列相似性及它们之间的进化关系来进行分类。之前的分类方法将凝集素分成了7大类,随着越来越多的凝集素被发现,这一分类方法已经不再合适,因此,现在普遍流行的分类方法是将植物凝集素分为12个家族,分别是双孢蘑菇家族(ABA)、苋科植物家族(Amaranthin)、几丁质酶相关蛋白家族(CRA)、蓝藻凝集素家族(Cyanovirin)、卫欧矛家族(*Euonymus europaeus*)、雪花莲家族(*Galanthus nivalis agglutinin*)、橡胶蛋白家族(Hevein)、木菠萝家族(Jacalins)、豆科家族(Legume lectin)、具有赖氨酸基序的蛋白(Lysin motif)、烟草凝集素家族(Nictaba)、蓖麻毒蛋白-B家族(Ricin-B families)^[6-7]。

Summer 和 Howell 于1936年发现凝集素可以专一性地结合糖。1960年, Howell 证实了植物凝集素有促细胞有丝分裂的作用。而对于植物凝集素

结构到了1975年才被证实, Becker 等首次解析出了伴刀豆球蛋白(Concanavalin A, ConA)的三级结构。ConA 是 D-葡萄糖和 D-甘露糖特异性的凝集素,现被广泛地应用于蛋白质组学的研究。ConA 在 pH 小于 5.5 的条件下,以二聚体形式存在;当 pH 大于 5.5 时, ConA 以四聚体的形式存在。ConA 单体结构展现出了 β -折叠结构,其包含一个卷曲的 7 片层的 β -折叠(前部)和一个平的 6 片层的 β -折叠(背部),并且前部和背部由转角和环状结构所连接^[8]。雪花莲家族也是研究很广泛的一个家族,这个家族的凝集素大都以二聚体或四聚体形式存在,其中每个亚基都具有相似的序列组成和相似的三级结构。雪花莲家族的代表,雪花莲凝集素(*Galanthus nivalis agglutinin*, GNA), 它的初晶结构于1990年被证实,随后到了1995年,对 GNA 初晶结构的进一步衍射被证实。GNA 以同源四聚体的形式存在,每个亚基包含三个子结构域,每个子结构域都由四片层的 β -折叠构成,这些子结构域在凝集素的碳水化合物识别过程中十分重要^[9]。另一个广泛研究的凝集素——麦胚凝集素(wheat germ agglutinin, WGA), 属于橡胶蛋白家族,被报道以稳定的同源二聚体的形式存在,每一条多肽链都包含四个橡胶结构域^[10]。

2 植物凝集素功能

2.1 植物凝集素最本质的功能——特异性的糖结合能力

植物凝集素是一类具有特异性糖结合活性的蛋白质,这是区别于所有其他植物蛋白的标志。由于糖结合域的保守性,植物凝集素一般只能结合一种单糖或寡聚糖。而在生物体中,一般起信号传递或转换的蛋白质均为糖蛋白,其糖链末端的糖残基因可被凝集素特异性识别并结合,从而促使凝集素与糖蛋白产生特异性相互作用,进一步引发下游一系列的生化信号级联反应^[1]。大量研究表明,在从凝集素进入靶位,与受体结合和产生相关生物学效应的整个过程中,其糖结合能力起到了最关键的作用^[3,11]。凝集素与受体糖的结合表现出如下特性:(1)一种凝集素只与含有一种糖分子的受体结合,如伴刀豆素 A 只与含甘露糖的凝集素受体结合;(2)各类凝集素对与其结合的受体糖分子中各个碳原子上的羟基、受体中糖链上与凝集素结合的糖分子的位置以及糖苷链的类型都有专一性;(3)凝集素的糖结合位点大小、形状、糖决定族在糖链中的位置、

配体糖的构象等都影响着凝集素与糖分子的结合；(4) 一个细胞膜上的凝集素还会随着细胞发展阶段的不同而发生种类、数量和位置上的变化。

2.2 细胞凝集能力

凝集作用是凝集素与细胞表面的含糖受体结合，由于一个凝集素通常具有两个以上的糖结合位点，因而能同时与多个细胞结合，使游离的单细胞聚集成团。凝集素因最早被发现能凝集红细胞而被命名，随着研究的深入和其凝集作用的机制的揭示，研究发现，凝集素不但能凝集红细胞，还可凝集其它细胞，如精子、淋巴细胞、细菌等^[12-13]。红花菜豆凝集素 (*Phaseolus coccineus* lectin, PCL) 对肿瘤细胞、某些菌类 (如大肠杆菌和酵母菌) 具有凝集作用，而且对不同肿瘤细胞呈现不同的凝集活性。实验表明，有些凝集素对红细胞的凝集作用具有种属专一性，有的则没有种属专一性。例如，狗脊蕨凝集素对人的 A、B、O 型血细胞的凝集活性相差不大，对其他种属来源的红细胞凝集活性有较大的差异，而红花菜豆凝集素对多种动物的红细胞具有凝集作用^[14-15]。由于不同的凝集素的糖结合特异性不会因环境而异，因此其对于不同细胞的凝集能力的不同能大致表明不同细胞表面糖受体组成的差异。

2.3 凝集素诱导凋亡和自噬

从 20 世纪 90 年代开始，多种凝集素被报道能够诱导哺乳动物细胞，尤其是癌细胞，发生凋亡。大概机制一般为：凝集素与细胞膜上相应受体相结合，激活 caspase 途径或通过内吞作用激活线粒体途径从而诱发凋亡。如伴刀豆球蛋白能在小鼠巨噬 PU5-1.8 细胞培养物中促使线粒体的聚集和细胞色素 c 的释放从而诱导凋亡，在黑色素瘤 A375 细胞中也具有较好的凋亡诱导能力^[16-17]；苦参凝集素 (*Sophora flavescens* lectin, SFL) 与 HeLa 细胞共培养时，能以时间和剂量依赖的方式激活典型的 caspase 途径诱导凋亡的发生^[18]。2007 年，植物凝集素 (伴刀豆球蛋白) 首次被证实能通过线粒体途径诱导肝癌细胞发生自噬，该成果极大补充了凝集素在诱导细胞死亡方面的作用，对于该过程的分子机制有了更清楚的认识^[19-21]。2010 年，Liu 等^[22-23] 首次发现一种单子叶植物凝集素——黄精凝集素 (*Polygonatum sibiricum* lectin, PSL)，不仅具有突出的凋亡诱导能力，同时还具有激活癌细胞自噬相关通路的双重功能。当与小鼠纤维瘤 L929 细胞共培养时，黄精凝集素能阻断 Ras-Raf 途径激活凋亡相关信号通路，同时能阻断 PI3K-Akt 途径从而增强细胞的自噬活

性。随着研究的逐步深入，越来越多的凝集素以及它们诱导癌细胞死亡的机制被不断揭示，为进一步药物开发提供了强有力的理论基础。

2.4 抗动物病毒

由于凝集素与其特异性糖的高亲和能力，使得它与相应的含糖受体结合更稳定，这也是凝集素抗病毒的最本质机理。常见途径有两条：(1) 凝集素与病毒上的蛋白质配体相结合，阻碍该配体与动物细胞表面的受体结合或信息交流；(2) 凝集素与动物细胞表面的含糖受体 (尤其是病毒识别的受体) 相结合，通过竞争性抑制，阻碍病毒的后续浸染过程。病毒在人和动物的感染性疾病中起着重要的作用，因而该方面的研究也显得十分重要。在各类凝集素中，雪花莲家族凝集素的抗病毒能力尤为突出。许多成果表明，该家族对于多种病毒均具有较好的抗性^[24]。在抗 HIV 研究领域，雪花莲凝集素和朱顶兰凝集素 (*Hippeastrum hybrid* agglutinin, HHA) 能选择性抑制 HIV 多种变异株系，阻止被 HIV 感染的细胞和 T 淋巴细胞产生胞合体。它们还可以直接和 HIV 糖被上的重要糖蛋白 (如 gp120 和 gp41) 结合，干扰 HIV 与靶细胞的融合，从而截断病毒进入细胞的途径，并将病毒有效而及时地清除出人体^[25]。同时最近一项研究指出，通过生物信息分析，多种雪花莲相关凝集素均与 H1N1 病毒具有很高的亲和能力，这意味着该家族凝集素可能在流感病毒的预防和治疗方面具有较好的应用前景^[26]。

2.5 防御功能

凝集素的防御功能主要体现在它在植物生长发育的各个阶段，以不同方式保护植物免受病虫害等的侵害。植物凝集素可识别并结合入侵者的糖结构域，从而干扰入侵者对植物产生的可能影响。许多植物凝集素可结合到诸如 Glc、Man 或 Gal 的单糖上，对植物中不常见的外来的寡糖具有更高的亲和性。另外，许多凝集素都很稳定，在较大 pH 范围内保持活性和稳定，对多种蛋白酶不敏感且耐高温，抗动物及昆虫蛋白酶。因此，凝集素在植物的防御反应中扮演着重要的角色，协同其他保护性蛋白防御病虫害。

2.5.1 抗真菌

有些真菌表面有葡聚糖、半乳糖、甘露糖等多糖或不同的异源多糖，几丁质结合凝集素可以通过与之结合抑制病原菌的侵染和生长。Mirelman 等^[27] 首次报道麦胚凝集素和马铃薯凝集素 (Potatin) 对真菌的生长具有抑制作用。体外研究表明，麦胚凝集

素抑制绿色木霉 (*Trichoderma viride*) 的孢子萌发及菌丝生长, 而狭叶荨麻凝集素 (*Urtica angustifolia* lectin, UAL) 能抑制灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*)、钩状木霉 (*Trichoderma hamatum*) 和布拉克须霉 (*Phycomyces blakesleeanus*) 的生长。巴西橡胶树分离出的橡胶蛋白 (Hevein) 能特异地与氨基葡萄糖及几丁质结合, 在低浓度的条件下就能对病原真菌如镰刀菌、稻瘟菌等有抑制作用。Mirelman 等^[27] 认为植物凝集素抑制真菌孢子萌发和菌丝生长是由于凝集素与真菌菌丝顶端微纤维交叉结合引起的。后来曾日中和黎瑜^[28] 发现壳三糖的加入可以提高热失活橡胶蛋白的抗真菌活性, 表明橡胶蛋白对真菌生长的抑制作用与其几丁质的结合特性有关。

2.5.2 抗植物病毒

植物病毒不含聚糖, 没有凝集素的作用位点, 因此植物凝集素对植物病毒无抑制作用, 但植物凝集素可通过一种基于与细胞壁糖类或细胞外聚糖相互作用的间接机制来防御植物病毒的入侵。有关植物凝集素结合细菌细胞壁肽聚糖的研究表明, 几种豆科植物种子凝集素与胞壁酸、N-乙酰胞壁酸、胞壁酰二肽能发生强烈的相互作用。马铃薯凝集素 (*Solanum tuberosum* lectin, STL) 能使青枯雷尔氏菌 (*Pseudomonas solanacearum*) 的无毒株系固定在胞壁上。毒性株系不能被凝集素识别, 避免被吸附到胞壁上。在土壤中, 种子迅速释放凝集素, 阻止细菌向萌发种子的趋化性运动, 由此可以避免潜在有害细菌对种子根的侵染。

2.5.3 抗昆虫

植食性昆虫消化道上皮细胞膜含有大量糖蛋白, 直接暴露于食物的内含物中, 细胞表面的糖链可能成为植物防卫蛋白的目标作用位点。当凝集素随食物进入昆虫肠道中后, 与位于上皮细胞表面的受体结合诱发局部或系统性毒害效应时, 就可能引起昆虫的拒食、生长停滞甚至死亡^[29]。近年来研究表明, 许多凝集素如豌豆凝集素 (Pea lectin)、雪花莲凝集素 (GNA)、麦胚凝集素 (WGA)、半夏凝集素 (*Pinellia ternata* agglutinin, PTA) 等对鳞翅目、同翅目等害虫具有良好的毒杀作用^[30]。凝集素抗虫机理尚不明确, 可能与昆虫肠腔部位的糖蛋白结合, 导致肠道功能蛋白失活, 从而影响营养物质的正常吸收, 同时引发病灶; 此外, 还能与膜上甘露糖结合, 降低细胞离子通透性, 降低营养物质的吸收, 导致细胞膜上电压紊乱, 最终导致多种病变的发生, 使昆虫生长停滞、感病甚至死亡^[31]。Saha 等^[32] 通

过实验发现凝集素通过与肠上皮细胞中刷状缘膜囊 (BBMV) 受体上的甘露糖结合, 引起细胞功能障碍以致昆虫死亡。Banerjee 等^[33] 通过配体印迹发现大蒜叶片凝集素 (*Allium sativum* leaf agglutinin, ASAL) 能与 Sym L 受体结合, 阻碍刺吸式口器昆虫传播病毒。

2.6 营养物质储存

植物凝集素的内源性功能是在种子成熟和萌发过程中作为储藏蛋白或对储存物质进行包装、运输或保护种子免于动物取食。研究发现凝集素在植物种子内的含量高达总蛋白的 2%~10%。成熟小扁豆种子的不同部位中凝集素分布及含量各不相同, 主要集中于子叶及胚中。对槐树凝集素 (*Sophora japonica* lectin, SJL) 在树皮中分布变化的研究表明, SJL 占树皮中可溶性蛋白的 30%, 作为储藏蛋白在形成层的生长过程中提供一定数量的氨基酸和单糖原料^[34]。

2.7 生物固氮

凝集素作为植物与微生物的共生介质, 在豆科植物和根瘤菌共生固氮作用中发挥专一性决定作用^[35-36]。Hamblin 和 Kent^[37] 首次报道了根瘤菌与凝集素能发生凝集作用, 并提出假说: 与菜豆凝集素结合的根瘤菌到达菜豆的根, 在适当的位点感染植物。Lerouge 等^[38] 认为在根瘤菌侵染宿主植物根表面时, 植物所产生的凝集素特异结合根瘤菌表面的 Nod 因子的寡聚几丁质部分或脂肪酸链, 使之吸附到宿主根表面, 然后结瘤, 行使固氮功能; 然而 Rhijn 等^[39] 却认为豆科植物凝集素是与适当的根瘤菌表面的特异性多糖而非 Nod 因子产生特异性的相互作用。利用基因工程技术, 将豇豆凝集素基因 (*psl*) 转入白三叶草根中, 所形成的根瘤菌是对豇豆根毛专一结合的, 此项工作不仅证实了凝集素在共生固氮中的作用, 而且还打破了植物宿主寄生种与种之间的专一性障碍。Eijsden 等^[40] 将豌豆凝集素基因 (*psl*) 及其糖结合能力缺失的突变体转入白三叶草中, 发现豌豆凝集素的糖结合部位是使白三叶草结瘤的活性区域, 同时提出与宿主凝集素相结合的根瘤菌受体是糖基。

3 凝集素的应用

3.1 凝集素在肿瘤医学中的应用

在过去的十多年里, 将凝集素运用于癌症的各方面研究中的思路变得更加成熟。大量研究表明凝集素对细胞间的黏着、靶细胞的识别、细胞定位、

癌细胞有丝分裂、跨膜信号转导、宿主免疫防御、细胞毒性以及细胞死亡等均有重要调控作用。因此在癌症的治疗和诊断中，凝集素也起到了越来越重要的作用。

3.1.1 凝集素在癌症研究中的应用

细胞表面的糖复合物构成细胞外被，这些碳水化合物成分与细胞黏连、营养成分吸收以及受体对各种生物活性物质活力均有密切关系。由于凝集素具有与特定糖基专一结合的特性。不同的凝集素与糖结合的专一性各异。利用这一特点，对其作为研究细胞膜结构的探针，在分子水平上研究细胞表面结构的变化，以阐明细胞恶变过程中膜结构的改变。目前，凝集素已用于全身各个系统肿瘤的研究^[41-42]。例如1984年Cooper^[43]报道正常膀胱上皮与PNA不发生反应，通过间接荧光免疫技术观察到69% O期乳头状移行细胞癌和50% B期移行细胞癌胞浆和细胞膜出现PNA阳性颗粒，提示PNA受体与膀胱细胞及其癌变过程关系十分密切。Söderström^[44]用7种凝集素(ConA、WGA、SBA、DBA、UEA-I、PNA和RCA)标记卵巢浆液性囊腺瘤和浆液性囊腺癌，发现ConA、WGA、UEA-I和RCA特异性地与良性肿瘤干细胞结合，PNA只与卵巢浆液性囊腺癌细胞结合，而DBA只与卵巢浆液性囊腺癌细胞结合，这些发现表明卵巢上皮含有不同的糖复合物，并且恶性肿瘤伴有糖复合物的改变。凝集素在良、恶性肿瘤的标记不同，有可能成为区别肿瘤良恶性的一个有用标志。同时应用凝集素来研究肿瘤细胞糖复合物的改变，有可能从分子生物学水平为探索肿瘤细胞发生发展规律开辟一条新的途径，并有可能为肿瘤的早期诊断、鉴别诊断提供一个新的指标。

3.1.2 凝集素在癌症治疗中的应用

就目前的研究来看，凝集素在癌症的治疗中有一方面的用途：(1)凝集素可增强抗癌药物的治疗作用效果；(2)凝集素能诱导癌细胞凋亡和自噬，可直接作为癌症治疗药物使用；(3)凝集素可作为抗癌药物的载体，用于开发肿瘤靶向药物^[45-46]。槲寄生提取物在临床上作为癌症患者化疗佐剂已经有效地运用了许多年，其中槲寄生凝集素通过与癌细胞端粒酶结合而抑制其转录活性，使癌细胞分裂时端粒不能正常复制而失去永生能力，同时也能提高癌细胞对于抗癌药物敏感性，因而被认为是最重要的活性成分^[47]。由于许多凝集素均有较好的抗肿瘤活性，而且又具有非免疫原性的特点，因此具有开发成为抗癌药物的前提条件。有报道称，ConA

具有自噬型细胞毒性和免疫调节的双重功能，在小鼠肝癌原位模型中，定期和定量的ConA饲喂，能使肿瘤组织明显萎缩^[19]。尽管目前大量的凝集素作为抗癌药物的研发仍局限在细胞和动物水平，但其显示出的优良性质(特异性、高细胞毒性等)是许多抗癌药物都无法达到的。例如，一个蓖麻毒蛋白分子每分钟能失活2000个以上的核糖体，杀伤力极强。该凝集素的A链进入细胞后，与核糖体亚基中的28S rRNA结合，使核糖体不能与延伸因子反应，导致蛋白质合成停止和细胞的死亡。同时在肿瘤细胞中越来越多的蓖麻毒蛋白结合位点被发现，使蓖麻毒蛋白能有效地靶向性作用于具有特定标志的肿瘤细胞^[48-50]。更有意义的是，这种高效的靶向效应可以使凝集素起到单克隆抗体那样的导航作用，通过同抗癌药物交联形成免疫毒素，把药物定向送至肿瘤组织。特别是第三代免疫毒素的产生，增加了免疫毒素的特异性、稳定性、渗透性，降低了免疫原性^[47,51-52]。因此，在癌症治疗中免疫毒素会具有更有效的临床效能。

3.2 凝集素在生物化学研究上的应用

近年来在分离提纯的专业领域中，利用植物凝集素来捕获糖蛋白已成为倍受青睐的技术。各种凝集素能识别特异性的糖并与之相结合，因此被誉为糖翻译器。它像探针一样捕获混合物中的含糖物质，为靶细胞、组织或机体的糖组学研究提供了重要信息。例如，把多种糖结合特异性不同的凝集素一起制成串联亲和柱，当糖蛋白依次循环通过不同类型的亲和柱时被捕获。这种串联的凝集素亲和层析技术大大拓宽了凝集素的糖识别谱，因而能更高效地覆盖和富集各种糖蛋白^[53]。

目前，研究人员正试图将一些凝集素偶联上标记分子(如同位素、荧光分子等)，为研究体内各种糖基化机制(如细胞分裂、分化、HIV的变异)和信号转导途径(如肿瘤转移、微生物感染)提供强有力的技术支持，同时也增强了研究结果的动态性。

3.3 凝集素在基因工程中的应用

3.3.1 转凝集素基因获得抗性植株

害虫是造成农林业减产的重要因素之一，喷施化学农药会造成环境污染，生物杀虫剂成本较高，转基因抗病虫作物的出现为人们防治植物病虫害开拓了新的思路。植物凝集素具有对鳞翅目、鞘翅目、双翅目特别是对同翅目蚜虫、飞虱、叶蝉等刺吸式口器害虫及一些微生物有防效^[54-59]，对环境无污染，

稳定性好及对高等动物相对安全等优点,因此,通过转基因技术利用植物凝集素基因来防治病害获得抗性品种已成为研究热点。

自1982年Hoffman等克隆出了第一个凝集素基因——菜豆凝集素基因(*pha*)以来,现在已分离出多种外源凝集素基因,成功用于植物抗病虫害基因工程的植物凝集素基因有雪花莲凝集素基因、豌豆凝集素基因、麦胚凝集素基因、大蒜叶片凝集素基因等,大都为单子叶甘露糖结合凝集素。其中雪花莲外源凝集素(GNA)、豌豆外源凝集素(Pea lectin)和大蒜叶片凝集素(ASAL)对哺乳动物的毒性低,却对害虫却有极强的抑制作用而倍受青睐。到目前为止,油菜、番茄、水稻、甘蔗、甘薯、向日葵、烟草、马铃薯、大豆和葡萄等多种植物获得了转GNA基因抗虫植株,均表现出一定的抗虫性,该基因在后代中能稳定遗传,符合孟德尔遗传规律。近年来发现ASAL在浓度比GNA低100~400倍时,即0.0025%(w/v),即可影响刺吸式口器昆虫的生长和繁殖能力^[60]。ASAL对褐飞虱和大叶青蝉致死率高于GNA,在转基因水稻中与对照相比死亡率分别高达83%和84%;GNA对白背飞虱更有效,致死率达90%^[61-63]。

根据转凝集素基因启动子选用不同分为两类,一类是用韧皮部特异表达启动子,如水稻蔗糖合成酶启动子RSsl构建的,凝集素基因只在韧皮部和一些未木栓化的组织中表达;一类是用花椰菜花叶病毒35S启动子CaMV35S构建的,在所有未木栓化的组织中表达。前者特异针对吸取韧皮部汁液营养的刺吸式口器害虫,如蚜虫、褐飞虱以及大叶青蝉等,后者可以针对各种取食部位的害虫,抗虫广谱性相对较高。针对不同种害虫选择合适的启动子或者选用经过改造的外源凝集素基因或者使用双价抗虫基因联合转化植株可以得到抗虫效果更好更广谱的抗性植株。

3.3.2 转凝集素基因提高生物固氮能力

由于凝集素在生物固氮中起到宿主植物专一性决定因子的特殊作用,将豆科植物凝集素基因转化到其他非豆科植物,使转基因植物可以被根瘤菌感染,获得固氮能力。Eijsden等^[40]将豌豆凝集素基因(*psl*)转入白三叶草中发现30天后75%以上的白三叶草都被*R.l. trifolii*感染结瘤。张静娴等将豌豆凝集素基因(*psl*)和血红蛋白基因(*phb*)同时转化到烟草中,原位杂交显示*psl*基因在根尖中表达,这与在豌豆和转基因白三叶草中表达位

置一致;在转紫花苜蓿时也得到类似的结果,大豆凝集素转入*Lotus corniculatus*后其根瘤菌结合特异性发生改变^[40,64,65]。Sreevidya等^[66]将豌豆凝集素基因(*psl*)和野生大豆凝集素-核苷酸磷酸水解酶(GS52)分别转入水稻中发现,转基因植株中外源基因的表达大大促进了根瘤菌在水稻根表皮细胞的聚集,且在水稻中的功能与在豌豆和大豆中相同。PSL和GS52通过与根尖尖端作用提高根瘤菌在根尖细胞表面附着和结瘤的能力,改变植物根尖细胞壁的构造,细胞壁局部溶解,使根毛或根上皮细胞对根瘤菌的水解作用更加敏感,形成根瘤菌的侵入线,从而有助于根瘤菌的侵染。由于GS52与磷酸代谢相关,转GS52的水稻不但增加了根瘤菌结瘤,还促进了外侧根的分化,转基因植株比对照植株高55%^[66]。拟南芥、烟草、苜蓿、水稻、沙棘等植物转入豆科凝集素基因后均成功结瘤或长出瘤状类似物,相信将来会有更多豆科凝集素基因用于转化非豆科植物,尤其是一些重要的农作物使它们提高固氮能力,达到少施化肥、增产粮食和保护环境的目。

4 总结与展望

凝集素由于其特异性的糖结合活性等,在许多生物学过程中均发挥着重要的作用。随着现代分子生物学、生物技术和生物化学的发展,植物凝集素研究的重点也由原来的分离纯化、一般性质研究转变到应用现代生命科学技术手段研究其结构、功能以及在生产实践、国民经济发展中的应用上来。研究表明,植物凝集素具有其丰富多样的生物学活性,如诱导细胞发生凋亡或自噬、抗动植物病毒、抗真菌和抗昆虫等,因而植物凝集素无论在生物医学还是生物农业方面都显示出了较好的研究价值和应用潜力。就目前的研究现状来看,植物凝集素的结构解析、抗癌细胞、抗病毒分子机制以及它们在农业上的应用研究将成为未来几年该领域的热点。随着科学技术的发展,植物凝集素的功能将更多地造福人类,植物凝集素的研究将出现崭新的一页。

[参 考 文 献]

- [1] Goldstein IJ, Hughes RC, Monsigny T, et al. What should be called a lectin? *Nature*, 1980, 285: 66
- [2] Sharon N, Lis H. Lectins as cell recognition molecules. *Science*, 1989, 246: 227-34.
- [3] Van Damme EJM, Peumans WJ, Barre N, et al. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and

- evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Crit Rev Plant Sci*, 1998, 17: 575
- [4] 孙册, 朱政, 莫汉庆. 凝集素[M]. 北京: 科学出版社, 1986
- [5] 李凤玲, 徐培洲, 肖炜, 等. 植物凝集素及其在抗虫基因工程中的应用. *安徽农业科学*, 2006, 34(3): 430-2
- [6] Jiang SY, Ma ZG, Ramachandran S. Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants. *BMC Evol Bio*, 2010, 10: 79
- [7] Van Damme EJ, Lannoo N, Peumans WJ. Plant lectins. *Adv Botanical Res*, 2008, 48: 107-209
- [8] Srinivas VR, Reddy GB, Ahmad N, et al. Legume lectin family, the 'natural mutants of the quaternary state', provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1527: 102-11
- [9] Hester G, Kaku H, Goldstein IJ, et al. Structure of mannose-specific snowdrop (*Galanthus nivalis*) lectin is representative of a new plant lectin family. *Nat Struct Biol*, 1995, 2: 472-9
- [10] Wright CS. Refinement of the crystal structure of wheat germ agglutinin isolectin 2 at 1.8Å resolution. *J Mol Biol*, 1987, 194: 501-29
- [11] Perillo NL, Marcus ME, Baum LG. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J Mol Med*, 1998, 76(6): 402
- [12] Koehler JK. Lectins as probes of the spermatozoon surface. 1981, 6 (3): 197-217
- [13] Lis H, Sharon N. The biochemistry of plant lectins (*phytohemagglutinins*). *Biochemistry* 1973, 42: 541-74
- [14] 刘艳如, 余萍, 郑怡. 狗脊蕨凝集素的分离纯化与部分性质. *植物生理学通讯*, 2003, 39(6): 647-50
- [15] 施炜星. 红花菜豆凝集素的生物学作用. *生物化学杂志*, 1995, 11 (5): 567-73
- [16] Suen YK, Fung KP, Choy YM, et al. Concanavalin A induced apoptosis in murine macrophage PU5-1.8 cells through clustering of mitochondria and release of cytochrome-c. *Apoptosis*, 2000, 5: 369-77
- [17] Liu B, Li CY, Bian HJ, et al. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells. *Arch Biochem Biophys*, 2009, 482: 1-6
- [18] Liu Z, Liu B, Zhang ZT, et al. A mannose-binding lectin from *Sophora flavescens* induces apoptosis in HeLa cells. *Phytomedicine*, 2008, 15: 867-75
- [19] Lei HY, Chang CP. Induction of autophagy by Concanavalin A and its application in anti-tumour therapy. *Autophagy*, 2007, 3: 402-4
- [20] Lei HY, Chang CP. Lectin of Concanavalin A as an anti-hepatoma therapeutic agent. *J Biomed Sci*, 2009, 16: 10
- [21] Chang CP, Yang MC, Liu HS, et al. Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine *in situ* hepatoma model. *Hepatology*, 2009, 45: 286-96
- [22] Liu B, Cheng Y, Bian HJ, et al. Molecular mechanisms of *Polygonatum cyrtonema* lectin-induced apoptosis and autophagy in cancer cells. *Autophagy*, 2009, 5(3): 432-3
- [23] Liu B, Cheng Y, Zhang B, et al. *Polygonatum cyrtonema* lectin induces apoptosis and autophagy in human melanoma A375 cells through a mitochondria-mediated ROS-p38-p53 pathway. *Cancer Lett*, 2009, 275: 54-60
- [24] Marchetti M, Mastromarino P, Rieti S, et al. Inhibition of herpes simplex, rabies and rubella viruses by lectins with different specificities. *Res Virol*, 1995, 146: 211-5
- [25] Balzarini J, Van Laethem K, Hatse S, et al. Profile of resistance of human immunodeficiency virus to mannose-specific plant lectins. *J Virol*, 2004, 78(19): 10617-27
- [26] Xu HL, Li CY, He XM, et al. Molecular modeling, docking and dynamic simulation of gna-related lectins for potential prevention in influenza virus (H1N1). *J Mol Model*, 2011 [Epub ahead of print]
- [27] Mirelman D, Galum E, Sharon N, et al. Inhibition of fungal growth by wheat germ agglutinin. *Nature*, 1975, 256: 414-6
- [28] 曾日中, 黎瑜. 橡胶蛋白——一种与乳胶凝固有关的具有抗真菌活性的植物凝集素. 1998, 15: 24-8
- [29] Peumans WJ, Van Damme EJM. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol*, 1995, 109: 347
- [30] 马员春, 马维亮, 宋晓华. 植物凝集素在作物转基因中的利用现状. *宁夏农林科技*, 2010, 3: 60-2
- [31] 张汉尧, 刘小珍, 杨宇明. 植物抗虫基因工程研究进展. *河南农业科学*, 2005, 3: 11-5
- [32] Saha P, Majumder P, Ray IDT, et al. Transgenic rice expressing *Allium sativum* leaf lectin with enhanced resistance against sap-sucking insect pests. *Planta*, 2006, 223: 1329-43
- [33] Banerjee S, Hess D, Majumder P, et al. The interactions of *Allium sativum* leaf gglutinin with a chaperonin group of unique receptor protein isolated from a bacterial endosymbiont of the mustard aphid. *J Biol Chem*, 2004, 279: 23782-9
- [34] Baba K, Ogawa M, Nagano A, et al. Developmental changes in the bark lectin of *Sophora japonica* L. *Planta*, 1991, 183: 462
- [35] 华永刚. 植物防卫蛋白——凝集素. 农业科技译丛, 1998
- [36] 王逸群, 荆玉祥. 豆科植物凝集素及其对根瘤菌的识别作用. *植物学通报*, 2000, 17(2): 127-32
- [37] Hamblin J, Kent SP. Carbohydrate-binding sites in plant lectins. *Nature New Biol*, 1988, 245: 28-30
- [38] Lerouge P, Roche P, Faucher C, et al. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulfated and acetylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*, 1990, 344: 781-4
- [39] Van Rhijn P, Goldberg RB, Hirsch AM. *Lotus corniculatus* nodulation specificity s changed by the presence of a soybean lectin gene. *Plant Cell*, 1998, 10: 1233-50
- [40] van Eijsden RR, Diaz CL, de Pater BS, et al. Sugar-binding activity of pea (*Pisum sativum*) lectin is essential for heterologous infectin of transgenic white clover hairy roots by *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae. *Plant Mol Biol*, 1995, 29: 431-9
- [41] Martin BM, Franklin WA. Lectin binding to human gastric adenocarcinomas and adjacent tissues. *Am J Pathol*, 1985, 119: 279
- [42] Macartney JC. Lectin histochemistry of galactose and N-acetyl-galactosaminic glyconjugates in normal gastric

- mucosa and gastric cancer and the relationship with ABO and accretor status. *J Pathol*, 1986, 150: 134
- [43] Cooper HS. Peanut lectin binding sites in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Cancer*, 1984, 53: 277
- [44] Söderström KO. Lectin binding to scroua ovarian tumours. *J Clin Pathol*, 1988, 43: 308-3
- [45] 孙册. 临床医学新工具——凝集素. 生命的化学, 1991, 11: 34-36
- [46] 胡业华. 凝集素的生物学研究. 江西教育学院学报(自然科学版), 2001, 22(6): 47-9
- [47] 王海燕, 白晓春, 罗深秋. 植物凝集素与医学应用. 生命的化学, 2003, 23(3): 224-6
- [48] 曾佑炜, 宋光泉, 彭永宏, 等. 蓖麻毒蛋白研究及应用进展. 亚热带植物科学, 2004, 33(1): 60-3
- [49] 张今, 秦德安, 陈百先, 等. 包有蓖麻毒蛋白的脂质体的制备、性质及毒性研究. 生物化学与生物物理学报, 1999, 31(4): 472-4
- [50] 张淑慧, 张淑群, 陈涛, 等. 基于糖及其偶联物的靶向给药体系, 肿瘤防治研究. 2007, 34(2): 157-60
- [51] 熊玉宁. 免疫毒素的研究进展. 国外医学: 肿瘤学分册, 2001, 2(2): 95-7
- [52] 李俊植. 免疫毒素研究及临床应用进展(一)临床前研究. 中国生物制品学杂志, 2004, 17: 1-24
- [53] Yang J, Zou QM, Cai SX, et al. Advances in analysis techniques of glycomics. *Prog Biochem Biophys*, 2005, 32(1): 9-12
- [54] Gatehouse AMR, Powell KS, Peumans WJ, et al. Insecticidal properties of plant lectins: their potential in plant protection [M]// Pustzai A, Bardocz S. Lectins: biomedical perspectives. London: Taylor and Francis, 1995: 35-58
- [55] Schuler TH, Poppy GM, Kerry BR, et al. Insect resistant transgenic plants. *Trends Biotechnol*, 1998, 16: 168-74
- [56] Nagadhara D, Ramesh S, Pasalu IC, et al. Transgenic indica rice resistant to sap sucking insects. *Plant Biotechnol J*, 2003, 1: 231-40
- [57] Nagadhara D, Ramesh S, Pasalu IC, et al. Transgenic rice plants expressing the snowdrop lectin gene (*gna*) exhibit high-level resistance to the whitebacked planthopper (*Sogatella furcifera*). *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 1399-405
- [58] Majumder P, Banerjee S, Das S. Identification of receptors responsible for binding of the mannose specific lectin to the gut epithelial membrane of the target insects. *Glycoconj J*, 2004, 20: 525-30
- [59] Sadeghi A, Smagghe G, Broeders S, et al. Ectopically expressed leaf and bulb lectins from garlic (*Allium sativum* L.) protect transgenic tobacco plants against cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*). *Transgenic Res*, 2008, 17: 9-18
- [60] Saha P, Majumder P, Dutta I, et al. Transgenic rice expressing *Allium sativum* leaf lectin with enhanced resistance against sap-sucking insect pests. *Planta*, 2006, 223: 1329-43
- [61] Yarasli B, Sadumpati V, Immani CP. Dasavantha reddy vudem1 and venkateswara rao khareedu, transgenic rice expressing *Allium sativum* leaf agglutinin (ASAL) exhibits high-level resistance against major sap-sucking pests. *BMC Plant Biol*, 2008, 102: 1470-83
- [62] Nagadhara D, Ramesh S, Pasalu IC, et al. Transgenic indica rice resistant to sap sucking insects. *Plant Biotechnol J*, 2003, 1: 231-40
- [63] Nagadhara D, Ramesh S, Pasalu IC, et al. Transgenic rice plants expressing the snowdrop lectin gene (*gna*) exhibit high-level resistance to the whitebacked planthopper (*Sogatella furcifera*). *Theor Appl Genet* 2004, 109:1399-1405
- [64] Zhang JX, Wang YP, Shen SH, et al. Transformation of pea lectin gene and *Parasponia haemoglobin* gene into rice and their expressions. *Acta botanica sinica*, 2001, 43: 267-4J
- [65] Van Rhijn P, Fujishige NA, Lim PO, et al. Sugar binding activity of pea lectin enhances heterologous infection of transgenic alfalfa plants by *Rhizobium leguminosarum* biovar. *Plant Physiol*, 2001, 126: 133-4
- [66] Sreevidya VS, Hernandez-Oane RJ, So RB, et al. Expression of the legume symbiotic lectin genes *psl* and *gs52* promotes rhizobial colonization of roots in rice. *Plant Sci*, 2005, 169: 726-36