

天花粉類抗癌蛋白之研究

Studies on trichosanthin-like antitumor proteins

林榮耀

台大醫學院生化學科

摘要

天花粉是以前中國鄉村常用的墮胎藥，它是由中國藥用植物 *Trichosanthes kirilowii* 的根部萃取得到。由天花粉分離純化出來的一種蛋白質被命名為 Trichosanthin (TCS)，其分子量大約 26 kDa，經由實驗證實具有抗腫瘤 (anti-tumor) 及抗愛滋病毒 (anti-human immunodeficiency virus) 的活性。一些報告指，TCS 出對於絨毛膜癌 (choriocarcinoma) 及黑色素瘤 (melanoma) 有較強之抑制活性。*Trichosanthes kirilowii* 屬於葫蘆科植物，在試管內 (*In Vitro*) 實驗證實 TCS 可以抑制兔子 reticulocyte cell free system 之蛋白質生合成，並且具有 N-glycosidase 的活性。因此本實驗希望由一些屬於葫蘆科的植物，如蛇瓜 (*Trichosanthes anguina*)、準人瓜 (*Sechium edule*) 等植物中篩選與 TCS 類似具有抗癌活性的蛋白質，同時進一步探討其作用機轉。由蛇瓜、準人瓜種子中純化出具有抑制蛋白生合成活性的蛋白，分別命名為 Trichosanthin-S 及 Sechiumin，由 SDS / PAGE 分析二者分子量分別為 35 kDa 及 28 kDa 且均由單一多肽所組成。抑制 cell-free system 的 IC_{50} 分別為 0.2 nM, 0.8 nM；以老鼠肝臟抽出之核糖體為材料測定其 N-glycosidase activity 得到其至 0.1 nM 均尚可有活性。另外若用完整的癌細胞分別處理這兩種蛋白，則需 5000~6000 nM 之濃度才能達到抑制蛋白質合成的 IC_{50} 。對於癌細胞生長或 DNA、RNA 生合成之抑制則不顯著，所以由這些結果顯示，Trichosanthin-S 及 Sechiumin 均如同 TCS 一樣屬於第一型 (type I) 核糖體抑制蛋白 (ribosome-inactivating proteins; RIPs)。由於是第一型核糖體抑制蛋白，無法進入完整細胞中所以毒殺完整細胞能力較差，但對於 cell-free system 則有很強的抑制蛋白合成效果，由老鼠肝臟核糖體的 N-glycosidase 活性測定中，可知這兩種蛋白有

很強的活性，因此接下來可以化學修飾法與其它特異性抗體連接 (cross-link) 發展免疫毒素 (immunotoxin) 以增加對特定癌細胞的毒殺作用。

關鍵詞：核糖體；核糖體抑制蛋白；免疫毒素

Abstract

Trichosanthin (TCS) was isolated from the Chinese medicinal herb, Tian-hua-fen obtained from root tubers of the Chinese plant, *Trichosanthes kirilowii*. It possesses anti-tumor and anti-human immunodeficiency virus properties. In vitro, TCS is more active toward choriocarcinomas and melanoma. *Trichosanthes kirilowii* belongs to the Curcubitaceae family, and so does *Momordica charantia*, from which a component similar to TCS was purified. The present investigation is to screen the similar anti-tumor activity as TCS from the members of Curcubitaceae family, for examples, *Trichosanthes anguina* (蛇瓜)、*Sechium edule* Swartz (準人瓜) and to character these biological activities. The aims of the study are to obtain these components or their derivatives for medical use such as the treatment of cancers. We purified two new toxic proteins, which we propose to call Trichosanthin-S and Sechiumin, from the seeds of *Trichosanthes anguina* and *Sechium edule* Swartz, Curcubitaceae growing in Taiwan. These two toxic proteins have all the properties of ribosome-inactivating proteins (RIPs) like the A-chains of abrin and the related toxins (ie Trichosanthin). These RIPs catalytically inactivate 60s ribosomal subunits by removing adenine from the position 4324 of 28s rRNA and thereby inhibit the protein biosynthesis. From SDS/PAGE, it shows that the molecular weights of Trichosanthin-S and Sechiumin were 35 kDa and 28 kDa respectively. The two toxic proteins inhibit the protein synthesis of a rabbit reticulocyte lysate with an IC_{50} of 0.2 nM and 0.8 nM respectively and have much less effect on protein synthesis of HeLa cells with IC_{50} of 5000~6000 nM. After rat liver ribosomes were treated with 0.1 nM

Trichosanthin-S or Sechiumin, the total rRNAs were isolated and treated with aniline, and a new rRNA fragment could be clearly observed from PAGE. Trichosanthin-S and Sechiumin belong to type I RIPs, which do not possess a lectin domain, do not bind easily to cells, and consequently have a relatively low native cytotoxic activity. With the aim of obtaining selectively toxic molecules, many RIPs have been conjugated to carrier molecules capable of delivering them to specific target cells. Antibodies are the obvious choice for preparing conjugates immunotoxins. Several type I RIPs have been used to prepare immunotoxin (ie gelonin, PAP, saporin), so we suggest that Trichosanthin-S and Sechiumin could cross link with specific antibodies to produce highly effective immunotoxins.

Keywords: immunotoxin, ribosome-inactivating proteins (RIPs), ribosome

壹、前言

Trichosanthin (TCS)是由中國藥用植物 *Trichosanthes kirilowii* 的根部塊莖(tuber)粉末所萃取得到的 26 KDa 蛋白，它是中國鄉村常用的墮胎藥—天花粉的主要成份。在動物模式(animal model)的實驗中 TCS 可以誘導墮胎[1,2]，其機制可能是經由直接且特殊地與胎盤滋養層細胞(trophoblasts)作用有關。除了墮胎的作用之外，TCS 亦具有免疫調節(immunomodulatory)[3]及抗癌(anti-cancer)[4]之活性。1989 年 McGrath 等人實驗證實[5]，在急性和慢性感染的淋巴細胞和單核吞噬細胞中，TCS 可以抑制人類愛滋病毒(human immunodeficiency virus)的複製，所以 TCS 在對抗愛滋病毒上亦具有臨床研究之價值。TCS 同時也是核糖體抑制蛋白(Ribosome-inactivating proteins; RIPs)的一個成員，可以經由其 N-glycosidase 活性特異地作用在真核細胞核糖體 28S rRNA 的 A₄₃₂₄ 位置，使得蛋白合成時延長因子(elongation factor-2; EF-2)不能與核糖體結合，因此抑制真核細胞內之蛋白生合成[6,7]。在很多高等植物(如葫蘆科、石竹科、大戟科、商陸科、豆科)之根部與種子普遍均存有 RIPs。近來應用生化及分子生物技術，將單株抗體(monoclonal antibody)與這些 RIPs 以雙硫鍵結合，形成所謂的「免疫毒白」(immunotoxin)，利用抗體能夠特異辨認目標細胞(target cell)，將 RIPs 帶入目標細胞，進而殺死目標細胞，這是一種殺死癌細胞治療癌症新方法[8]。例如：1991，Wang 等人[9]將 TCS 與人類肝癌單株抗體 "Hepama-1" 以 N-

succinimidyl-3-(2-pyridyl)-dithiopropionate 共價連接，可以提昇對肝癌細胞毒性達 500 倍。所以含 TCS 的免疫毒蛋白被視為相當具有潛力的肝癌治療方式。由其它的活體外(*in vitro*)細胞毒性實驗顯示有 2 種癌細胞對 TCS 最為敏感，分別是絨毛癌(choriocarcinoma)及黑色素瘤(melanoma)，TCS 被發現可以抑制絨毛膜癌及惡性胎塊（絨毛膜腺瘤，malignant mole）中 trophoblastic cells 之不正常生長[10]。單獨使用 TCS 或與其它的抗癌藥物，中藥或化學療法藥物合併使用，對治療惡性胎塊及絨毛膜癌均有相當的療效[11]。

現今一般對於癌症的治療主要使用三種方法，其一為使用放射線殺死癌細胞，第二種是以外科手術切除癌症部位，第三種則是目前受到重視的——利用藥物（天然或人工合成）進行化學治療[12]。近年來抗癌藥物的研究發展日益增多，這些抗癌藥物的共同特徵是造成細胞內大分子(DNA, RNA, protein)生合成受到抑制，進而抑制了癌細胞的生長。這些天然藥物對不同之腫瘤細胞有不同的細胞毒性，由於腫瘤細胞的種類繁多，因此，近年來不斷有新的抗癌藥物被開發出來進行臨床試驗[13]。這其中，中藥抗癌的研究受到學者很大的重視，一些台灣天然藥用植物單離成份被分離出來，並分析其結構[14, 15]，而這些傳統中藥分離物對抑制特定癌細胞有相當的效果，因此，中藥實為提高抗癌成效的一個重要天然資源。

由於 TCS 是從 *Trichosanthes kirilowii* 所得到的，本研究擬由其他同為台灣常見之葫蘆科藥用植物如蛇瓜(*Trichosanthes anguina*)、準人瓜(*Sechium edule* Swartz)植物中篩選出與 TCS 類似具有抗癌及抗愛滋病毒活性之蛋白質，同時進一步探討其作用機轉，以活體外(*in vitro*)抑制兔子 reticulocyte lysate cell free system 蛋白質生合成[16]，以及對 28S rRNA A₄₃₂₄ 位置的 N-glycosidase 活性[17]來篩選天花粉類之抗癌蛋白質，同時針對腫瘤細胞測試其對這些天花粉類蛋白的敏感性，以分析這些天花粉類抗癌蛋白對 cancer cell line 是否具有不同的細胞毒性。另外，分析這些天花粉類抗癌蛋白之氮端胺基酸序列，與其它已發現的 RIPs 比較，將來探討其活性位置，以便日後能再進一步進行免疫毒蛋白臨床研究，期待能更有效地控制癌症。

貳、材料與方法

一、天花粉類抗癌蛋白純化：

秤取 400 克蛇瓜、準人瓜種子，以蒸餾水洗淨後切成小塊，置於 600 ml 0.05 M 醋酸溶液中。以攪拌機打成漿汁狀。漿汁用高速離心機以 12,000 rpm 4°C 離心 20 分鐘。取上清液於 4°C 下慢慢加入硫酸銨至 95 % 的飽和度，待完全加入後繼續攪拌 1 小時，接著以 18,000 rpm 4°C 離心 25 分鐘，取沉澱物置於透析袋內，對 10 mM pH 5.0 之醋酸鈉緩衝溶

液進行透析。將透析過之粗蛋白通入已平衡之 Sephadex G-75 column (90 x 2.4 cm)，收集有活性部份，將其再通入預先以 10 mM pH 5.0 醋酸鈉緩衝溶液平衡之 CM-52 cellulose column (7 x 3.5 cm)，以含 0-0.4 M 氯化鈉梯度之醋酸鈉緩衝溶液引流，取有活性部份，再注入 FPLC Mono-S column (1.6 x 50 mm)，以 0-0.5 M 氯化鈉梯度之醋酸鈉緩衝溶液引流，可得到純化的天花粉類抗癌蛋白。蛇瓜之粗萃取液則經由 DE-52 cellulose (7 x 3.5 cm) 及 CM-52 cellulose column (7 x 3.5 cm) 可得純化之蛋白。

二、天花粉類抗癌蛋白對無細胞(cell-free)蛋白合成抑制之影響[18]

利用 Rabbit reticulocyte lysate translation system 依序加入 (1) 17.5 μ l Reticulocyte lysate; (2) 0.5 μ l RNasin ribonuclease inhibitor (40 U/ml); (3) 0.5 μ l Amino acid mixture (Leu⁻); (4) 0.5 μ l [³H]-Leucine (1 mci/ml); (5) 2.0 μ l 天花粉類抗癌蛋白; (6) 4.0 μ l BMV mRNA (500 mg/ml)，最後反應體積為 25.0 μ l。加入試劑混合均勻後，在 30°C 反應 60 分鐘。加入 225 μ l 1N NaOH / 2% H₂O₂，在 37°C 下作用 10 分鐘，然後加入 25% TCA 1 ml 使蛋白沈澱下來。將反應液吸到 Whatman GF/C glass fiber filter，以 3 ml 5% TCA 洗滌紙 3 次，接著以 1 ml 95% 酒精洗 GF/C glass fiber filter 2 次，將濾紙抽乾後取出濾紙置於閃爍計數瓶中，加入 3 ml 閃爍液(Scintillation liquid)，以 β -counter 測定其放射量。

三、天花粉類抗癌蛋白 N-glycosidase activity 之測定[19, 20]

(一) 大白鼠(Wistar)先禁食 2 小時，以斷頭的方式犧牲，取出肝臟。以 PBS 將肝臟洗數次，用剪刀將肝臟剪成泥漿狀，以均質機(Homogenizer)將肝臟均質化。將均質化之溶液離心 10 分鐘取出上層液，每 18 ml 上清液加入 2.7 ml 新鮮配置的 10% DOC，混合均勻之後，在冰浴中反應 20 分鐘。超高速離心管內先加入 3 ml 2M 蔗糖及 4 ml 0.5M 蔗糖，再將 DOC 處理過之上層液 5 ml 加至超高速離心管內，24,500 rpm，4°C 下離心 3.5 小時。取出 pellet 溶於 200 μ l 之 rsuspension buffer，以 3000g 離心 10 分鐘，取上層液即為純化的核糖體。

(二) 80S 核糖體(82 μ g)與 20 μ l 5 x buffer B 及不同濃度之天花粉類抗癌蛋白(以 Abrin-A 為 positive control)混合均勻，至最後體積為 110 μ l，在 37°C 下反應 15 分鐘。以等體積之 Acid phenol 將蛋白質沈澱下來，經充份混合均勻之後，在室溫下以 15,000 rpm 離心 15 分鐘取出上層液，加入 1/10 體積的 3M 醋酸鈉及 2.5 倍總體積的 95% 酒精將 RNA 沉澱下來，以 Speed Vac 將沈澱物抽乾，每組樣本取一管繼續以 40 μ l

aniline 在冰浴中處理 10 分鐘。加入 400 μ l DEPC 處理過之蒸餾水使反應停止，亦以醋酸鈉及酒精沉澱出 RNA，將沈澱以 Speed Vac 抽乾，連同前面各組未處理 aniline 之 RNA 樣本，各加入 20 μ l 的 gel loading buffer 混合均勻之後以 25mA 電流跑 3.5% 聚丙烯醯胺板膠電泳(含 7M 尿素)。以 ethidium bromide 染色 10 分鐘，在 UV 燈下可見到 5.8S、5S、18S、28S 及所切出的 RNA 片段。

四、天花粉類抗癌蛋白對癌細胞蛋白質合成之抑制作用[21]

各實驗組腫瘤細胞以含 10% 胎牛血清之培養基在 37°C, 5%CO₂ 中培養。取細胞 1×10^5 cells/well 培養於 24well-microplate 中 18 小時，俟細胞附著於培養皿底部後，吸去上層培養基，以 PBS 洗兩次，加入不同劑量天花粉類抗癌蛋白，在 37°C, 5%CO₂ 內培養 4 小時後，將培養基吸去，換成含 0.5 μ Ci [³H]-Leu 之培養基，繼續培養 1 小時。接著加入 1 ml 0.1N 氫氧化鈉處理 30 分鐘將細胞溶解。然後加入 10%TCA 把蛋白沉澱下來，再將整個溶液吸到 GF/C 濾紙上，以 5%TCA 洗 GF/C 濾紙三次，接著以 10% 酒精洗兩次，待完全抽乾之後，將濾紙放入閃爍計數瓶內，加入 3 ml 閃爍液，以 β 計數器計算其放射性強度，以對照組(不加入毒蛋白)當做 100%，再以實驗組與之相除，即可得到抑制百分比。

五、天花粉類抗癌蛋白對癌細胞生長及 DNA、RNA 生合成之抑制

各實驗組腫瘤細胞以含 10% 胎牛血清之培養基在 37°C, 5%CO₂ 中培養。取細胞 1×10^5 cells/well 培養於 24well-microplate 中，加入不同劑量天花粉類抗癌蛋白，在 37°C, 5%CO₂ 內培養 24 小時後再以 1971 年由 Amstrong[22] 所發展出的半微量染料結合法(Semi-micro dye-binding assay)處理。首先每個 well 以 100 μ l PBS 沖洗後，再浸漬於 50 μ l 的染色液(0.5% methylrosaniline chloride、0.85% NaCl、5% formamide (V/V) 及 50% ethanol) 20 分鐘後，以蒸餾水沖洗兩次後經由 Microplate photometer 測其 540 nm 之吸光度。另各實驗組腫瘤(1×10^5 cells/well) 於 24 well-microplate 中含有 10% 胎牛血清之培養基在 37°C, 5%CO₂ 下中培養 24 小時，加入不同劑量天花粉類抗癌蛋白，在 37°C, 5%CO₂ 內培養 1 小時後換成含有 ³H-Thymidine(若測定 RNA 生合成情形則加入含有 ³H-Uridine)之培養基繼續培養 4 小時，收細胞後，將內毒物沉澱下來以 β 計數器計算其放射性強度。

六、天花粉類抗癌蛋白對裸鼠移植性腫瘤之抑制效果[23]

選取 6~8 週之裸鼠，將實驗癌細胞(5×10^5)以側面皮下注射，3

天後選擇長出腫瘤大小約 80 mm^2 之裸鼠，將這些天花粉類抗癌蛋白以不同劑量打入其腫瘤生長部位，每隔四天注射一次，持續兩個星期，於第 20 天觀察腫瘤大小情形，或是有無繼續存活。

七、天花粉類抗癌蛋白胺基酸組成與序列之分析

(1) 由葫蘆科植物中純化出來的天花粉類抗癌蛋白 500 pmole，經抽乾後加入 $200 \mu\text{l}$ 6N HCl，將樣品抽氣降壓至 100 millitorr，並置於 150°C 水解 1 小時，經抽乾後以 sodium citrate 緩衝溶液溶出胺基酸，以 Beckman 6300 system 胺基酸自動分析儀分析胺基酸組成。

(2) 500 μg 花粉類抗癌蛋白抽乾後，以 $100 \mu\text{l}$ 10 M urea 溶解，以蛋白分解酵素(如 lysyl endopeptidase[24]、trypsin、chymotrypsin、thermolysin[25]或 pepsin)水解之，接著利用 HPLC C18 column 或 Sephadex C-25 column 將各胺基酸片段分離純化出來，以 ABI 477A/120A protein/peptide sequencer 分析其氮端胺基酸序列。

(3) 將所得到的花粉類抗癌蛋白氮端胺基酸序列與目前已知的抑癌蛋白或核糖體抑制蛋白做一比較，以進一步探討天花粉類蛋白的活化位置(active site)。

八、花粉類抗癌蛋白與病毒 DNA 或 RNA 之結合分析(Binding assay)[26]

HIV-1 long terminal repeat (LTR) supercoiled DNA、HIV-1 RNA 100-200 ng 與 $10 \mu\text{l}$, 20mM 花粉類抗癌蛋白於 30°C 反應 30(或 60)分鐘。取出 $5 \mu\text{l}$ 反應樣本以 0.5% SDS 30°C 處理 10 分鐘。接著跑 1.2% agarose gel 電泳，gel 以 ethidium bromide 染色後在 UV 燈下觀察蛋白與 DNA，RNA 結合情形。

參、結果

一、天花粉類抗癌蛋白之純化：

將市售蛇瓜及準人瓜(*Sechium edule* Swartz)以 0.05 M 醋酸緩衝溶液萃取，所得之粗萃取液以 0-95% 飽和濃度的硫酸銨把蛋白沉澱下來，將沉澱物以 0.01M 醋酸鈉緩衝溶液完全透析。準人瓜透析液通過 Sephadex G-75 膠體過濾管柱，以波長 280 nm 光譜測定蛋白含量，可得到一個吸收峰之層析圖(圖一)，經過試管內轉譯抑制活性(*in vitro* translation inhibition activity)測定，收集有活性部份，再通過 CM-52 cellulose 離子交換管柱，希望經由通此管柱除去色素及大部份雜蛋白。結合於管柱之蛋白以含有 0-0.4 M 氯化鈉連續梯度之醋酸鈉緩衝溶液沖流，沖出的溶液以波長 280 nm 光譜測定蛋白含量，得到一個層析圖

(圖二)，經由活性測定，收集有活性部份，再通過第三根管柱 — FPLC Mono S column，以含有 0-0.5 M 氯化鈉連續梯度之醋酸鈉緩衝溶液沖流，經 280 nm 光譜測定，可得到有三個吸收峰之層析圖(圖三)，經過活性測定，在第二個吸收峰可得到純化的 Sechiiumin。取通過各管柱後有活性部份的蛋白溶液以 SDS/PAGE 分析(圖四)，可清楚觀察到所純化出來的 Sechiiumin 具有很高純度，確定 Sechiiumin 已均質化(Homogenous)，同時也可經由此圖比較各純化步驟的分離效果。由表一，由 400 克準人瓜種子，經過 Sephadex G-75 膠體過濾管柱、CM-52 cellulose 離子交換管柱及 FPLC Mono S 管柱之後，分別得到 262、12.2 及 3.1mg 的蛋白，同時各個步驟之後所獲得的專一活性(Specific activity)分別為 1.2×10^4 、 2×10^5 及 6.6×10^5 ，而總活性(Total activity)則為 3.14×10^6 、 2.44×10^6 及 2.04×10^6 ，而蛇瓜透析液通過 DEAE cellulose column 及 CM-52 cellulose (圖五)之後，可分別得到 560 mg 及 45 mg 的蛋白，而純化之 Trichosanthin-S 其純度可由 SDS/PAGE 得知 (圖六)，由 500 g 蛇瓜種子可得 45 mg 之純蛋白(表二)。

二、天花粉類抗癌蛋白對無細胞蛋白生合成抑制之影響：

RIPs 的特性是抑制真核細胞核糖體的活性，使蛋白質不能合成 [27]，Barbieri 和 Stirpe 等人指出第一型 RIPs 由單一多肽鏈構成，沒有類似凝集素(Lectin)的區域可接到細胞膜表面，所以對完整細胞(intact cells)的毒性很低，但是對於非細胞系統則有很強的抑制能力 [28]，因此我們先以非細胞系統來測定這兩毒蛋白抑制蛋白質生合成的能力。本實驗使用 rabbit reticulocyte lysate 為非細胞系統，外加核糖核酸水解酵素之抑制劑(RNase inhibitor; RNasin)、BMV mRNA、不含白胺酸(Leu)之胺基酸混合液及 [^3H]-Leu，與不同濃度的 Sechiiumin 或 Trichosanthin-S 一起作用，同時以 Abrin-a A 鏈為 positive control，最後以 β 計數器計算生合成蛋白的放射性強度(CPM)，再與沒有放入毒蛋白的對照組之放射性強度比較，可得到蛋白質生合成抑制比例。圖七、八表示 Sechiiumin 及 Trichosanthin-S 與 Abrin-a A 鏈抑制非細胞系統蛋白生合成的情形，其中 Sechiiumin 抑制百分之五十蛋白生合成(IC_{50})的劑量為 0.8 nM，trichosanthin-s 為 0.2 nM 而 Abrin-a A 鏈則為 0.1 nM。

三、天花粉類抗癌蛋白 N-Glycosidase activity 之測定：

由老鼠肝臟中抽取核糖體，再以毒蛋白處理，觀察這些毒蛋白對核糖體 RNA 的影響。由兩個月大的老鼠(Wistar)肝臟中，可得到約 2.5 毫克的 80S 核糖體，其 RNA 的部份經過 Acid phenol 萃取及 95% 酒精沉澱後，以聚丙烯醯胺板膠電泳檢驗，發現其包含 28S、18S、5.8S 和 5S rRNA

的條帶，為可用的核糖體。接著以 10、1、0.1 及 0.01 nM Sechiuin 或 Trichosanthin-S 各兩個樣本與抽出的核糖體作用，同時以 10、1、0.1 及 0.01 nM Abrin-a A 鏈各兩個樣本作為 positive control。經過毒蛋白處理之後，以 acid phenol 和 95% 酒精將 rRNA 萃取出來，每種濃度毒蛋白作用過之 rRNA 取一個樣本繼續以 aniline 處理，然後同前述方法將 rRNA 再次沉澱出來，最後有無處理 Aniline 之樣本均以 3.5% 聚丙烯醯胺板膠電泳檢驗。由圖九、十可清楚看到：不加入毒蛋白之對照組不論有無處理 aniline 皆沒有一段特殊 RNA 片段出現，當有加入毒蛋白的核糖體經 aniline 處理，就可見到此 RNA 片斷(如箭號指示)，其大小約有 420 個核苷酸。核糖體以 1 nM Sechiuin 或 Trichosanthin-S 作用可清楚出現此 RNA 片段，若以 0.1 nM Sechiuin 作用則只能隱約看到此 RNA 片段。核糖體若以 Abrin-a A 鏈作用，在 10、1 和 0.1 nM 的濃度下均可現此 RNA 片段。

四、天花粉類抗癌蛋白對癌細胞蛋白質合成之抑制作用：

由於第一型 RIPs 缺乏類似凝集素可與細胞膜結合之區域，所以對完整細胞的毒性非常低。為了檢驗 Sechiuin 或 Trichosanthin-S 對完整細胞蛋白生合成的影響，選用 HeLa cells 為標的細胞(Target cells)，將之培養於 24-well 培養皿，加入 50、100、1000、3000 及 5000 nM Sechiuin 或 Abrin-a A 鏈，同時以屬於第二型 RIPs 的 Abrin-a 為對照組培養 4 小時。再加入新的 Leu-free 培養基和 [^3H]-Leu，繼續培養 1 小時，接著以 0.1 N 氫氧化鈉將細胞溶解，以 10% TCA 把蛋白沉澱下來，最後用 β 計數器計算生合成蛋白放射性強度。圖十一、十二表示兩種毒蛋白抑制 HeLa cells 蛋白生合成的曲線圖，其中 Sechiuin、Trichosanthin-S 及 Abrin-a A 鏈抑制 HeLa cells 蛋白生合成的 IC_{50} 界於 5000-6000 nM，而完整的 Abrin-a 其 IC_{50} 為 0.05 nM。

五、天花粉類抗癌蛋白對癌細胞生長或 DNA、RNA 生合成之抑制：

由於 Sechiuin 及 Trichosanthin-S 與 TCS 均屬於 type I 之核糖體抑制蛋白，無法結合至完整細胞表面。所以對於抑制完整細胞(intact cells)之細胞生長或 DNA、RNA 合成之效果並不明顯。雖然在培養基投予高劑量的毒蛋白，均不能對完整的癌細胞(採用 HeLa cells)有抑制作用。圖十三、十四表示二種毒蛋白對完整細胞 HeLa cells 生長沒有顯著抑制作用。

六、天花粉類抗癌蛋白對裸鼠移植性腫瘤之抑制效果：

本實驗屬於 *in vivo* 測試毒蛋白實際用再生物體是否有治療效

果，施行方式是直接將毒蛋白打入腫瘤長出部位(intralesional administration)。由表三可知，當打入 10 ug Sechiumin 時腫瘤消退 31.1%，當劑量逐漸增加至高達 1000 ug 時腫瘤只消退了 50 %。由表四可知，當打入 10 ug Trichosanthin-S 時腫瘤消退 31.1 %，當劑量逐漸增加至高達 1000 ug 時腫瘤只消退了 47.2 %。

七、天花粉類抗癌蛋白胺基酸組成及氮端序列分析：

本實驗採用酸水解的方法，以 6 N 氫氯酸於 150°C 作用 1 小時，可將 Sechiumin 水解成胺基酸，再分別與 Ninhydrin 作用，通過胺基酸組成自動分析儀之陽離子交換管柱(Cationic ion exchange column)，可使各種胺基酸於不同時間跑出，經由光譜定量，再與標準胺基酸比較，便可得到 Sechiumin 及 Trichosanthin-S 之胺基酸組成之種類與數目。由表五可得：Sechiumin 由 264 個胺基酸所組成，而 Trichosanthin-S 由 291 個胺基酸組成。

另外分析這兩種蛋白之氮端序列，再與其它已知的核糖體抑制蛋白之比較，見表六。

八、天花粉類抗癌蛋白與病毒 DNA 或 RNA 之結合分析：

將 HIV-1 long terminal repeat (LTR) supercoiled DNA，HIV-1 RNA 100-200 ng 與 20 mM Trichosanthin-s，Sechiumin 作用 30 或 60 分鐘，再跑 1.2% agarose gel 電泳，gel 以 ethidium bromide 染色，結果在 UV 燈下觀察，並沒有 DNA、RNA 結合之現象。

肆、討論

本實驗使用坊間購得與 TCS 同為葫蘆科(Cucurbitaceae)植物——準人瓜(*Sechium edule* Swartz)及蛇瓜(*Trichosanthes kirilowii*)為樣本，純化萃取得到二種新的第一型 RIPs，我們將之命名為 Sechiumin 與 Trichosanthin-S。純化出來的兩種核糖體抑制蛋白具有很高的純度，由圖四與圖六之 SDS/PAGE 確定其已均質化(homogenous)。由表一、二可知各個純化步驟之後所得到的蛋白含量及專一活性(specific activity)，在 400 克準人瓜種子中萃取得到約 3.1mg 的 Sechiumin，就含量而言並不十分豐富，為了得到較大量蛋白，希望先定其部份胺基酸序列，配合氮端胺基酸序列再利用分子生物技術將此蛋白的基因選殖(clone)出來，可大量表現；但是由 400 g 蛇瓜種子中可得到 45 mg Trichosanthin-S，則屬豐富的產量。這兩種蛋白的分子量，經由與標準蛋白的 SDS/PAGE 分析，Sechiumin 為 28 kDa 左右，而 Trichosanthin-S 則為 35 kDa，可能 Trichosanthin-S 為一糖蛋白的緣故。將 Sechiumin、Trichosanthin-S 胺

基 酸 組 成 (表 五) 與 其 它 第 一 型 RIPs (如 Trichosanthin[29]、Momorcochin-S[30]、PAP[31]、Trichokirin[32]、Dianthin[33]、Gelonin[34]) 比較，發現在胺基酸組成中 Glx(Glu, Gln)、Asx(Asp, Asn) 佔有很高比例；Sechiumin 中 valine、alanine、leucine 的含量較高，而 Trichosanthin-S 則具有較多的 alanine、leucine，由與其它核糖體抑制蛋白的氮端序列比較，可以發現在氮端有 3 個 conserved amino acids，另有 4~5 個 homologous amino acids (表六)。

在 Sechiumin 與 Trichosanthin-S 對非細胞系統蛋白生合成抑制實驗結果中，可以得到這兩種核糖體抑制蛋白抑制非細胞系統蛋白生合成百分之五十的劑量(IC_{50})為 0.8 nM 與 0.2 nM，Abrin-a A 鏈的 IC_{50} 為 0.1 nM，所以純化出之 Sechiumin 其毒性效果較 Abrin-a A 鏈弱了 8 倍左右，但仍比一些已發現的第一型 RIPs 如 MAP-30(IC_{50} : 3.3 nM)[35]、TAP-29(IC_{50} : 3.7 nM)[5]及 Tritin(IC_{50} : 2.3 nM)[36]等稍強。由這個實驗結果初步證實 Sechiumin 具有抑制蛋白生合成的能力，但僅有此結果尚不足以十分肯定這種抑制是發生在核糖體。1987 年 Endo 和 Tsurugi 等人[7]將 Ricin、Abrin 及 Modeccin 的 A 鏈與老鼠肝臟之核糖體一起反應，接著將 rRNA 以 SDS、phenol 萃取出來，再以 aniline 於酸性環境下處理十分鐘，aniline 的作用乃在去嘌呤(depurine)位置將磷酸雙酯鍵(phosphodiester bond)切斷，由含有 7 M 尿素的丙烯醯胺電泳分析，可以發現在同樣位置出現一 RNA 片段(大小約 420 核甘酸)。他們更進一步分析得知這些毒蛋白是作用在 28S rRNA 上，由序列分析顯示：釋放出的片段少了 4324 位置的腺嘌呤(A_{4324})，所以 Endo 和 Tsurugi 等人對 RIPs 的作用機轉提出一個推測：RIPs 具有特殊的 N-glycosidase 活性，能夠在 28S rRNA A_{4324} 上進行修飾作用(modification)，將此腺嘌呤切除，使得合成蛋白之 elongation factor-2 不能與 rRNA 結合，進而抑制蛋白合成。因此有了前面 Sechiumin 抑制非細胞系統蛋白生合成的初步證據之後，我們進一步由老鼠肝臟中抽出核糖體，再加入不同濃度的 Sechiumin 或 Trichosanthin-S 一起反應，並且以 Abrin A 鏈做為 Positive control，將 rRNA 萃取出來以 aniline 處理，最後由含有 7 M 尿素的丙烯醯胺電泳分析，可以發現無論以 Sechiumin、Trichosanthin-S 或 Abrin A 鏈與核糖體一起反應，均可在相同位置釋放出一段 RNA 片段(圖九、十，箭號指示處)。由添加的劑量來看，Sechiumin 或 Trichosanthin-S 加入濃度降至 0.1 nM 只可隱約出現此片段，而 Abrin A 鏈在 0.01 nM 仍可隱約見到此片段(圖十)，這些結果與前述非細胞系統蛋白生合成抑制實驗所得到的 IC_{50} 相差不多。因此由核糖體 rRNA 的修飾作用，可更強烈證實 Sechiumin 及 Trichosanthin-S 與 TCS 及 Abrin 一樣是一種 RIPs。

根據 Stirpe 和 Barbieri 的分類，第一型 RIPs 由單一多肽鏈(A 鏈)組成，缺乏第二型 RIPs 特有的細胞膜結合多肽(B 鏈)，所以已知的第一型 RIPs 不易進入細胞內，對完整細胞的毒性都很低。我們以一般癌症細胞實驗常使用的 HeLa cells 為標的細胞來測試 Sechiumin 及 Trichosanthin-S 對完整細胞中蛋白 DNA 及 RNA 生合成抑制的情形，同時以 Abrin-a A 鏈及完整 Abrin 來作對照實驗。由圖十一、十二可得知，Sechiumin 及 Trichosanthin-S 抑制 HeLa cells 蛋白生合成的 IC_{50} 界於 5000-6000 nM，大約是這二種蛋白抑制非細胞系統蛋白生合成 IC_{50} 的 10^4 倍。而 Abrin-a A 鏈的 IC_{50} 與此二種蛋白差不多，但完整的 Abrin-a 對於 HeLa cells 蛋白生合成有非常強烈的抑制效果。另外由 Sechiumin 及 Trichosanthin-S 對 HeLa cells 生長影響的實驗中(圖十三、十四)，可以發現即使 Sechiumin 及 Trichosanthin-S 在遠高於抑制非細胞系統蛋白生合成 IC_{50} 的劑量下仍不影響細胞生長。另外高劑量的毒蛋白對 HeLa cells 中 RNA、DNA 合成並不具明顯影響性。這些現象與以前一些報告[6, 27, 28]所指出的：第一型 RIPs 不易進入細胞的性質是相符合的，惟有在很高濃度時可能藉由胞飲作用或擴散進入細胞，而第二型 RIPs (如 Abrin-a)對完整細胞有很強的毒性。因此本實驗所純化萃取得到的二種核糖體抑制蛋白 — Sechiumin 及 Trichosanthin-S 均是屬於第一型 RIPs，其對非細胞系統的蛋白生合成有強烈的抑制效果，而對完整細胞則是相當無毒性的，同時這兩種蛋白並不與 HIV 的 DNA 或 RNA 有結合作用，在裸鼠腫瘤實驗中，並不具顯著抑制腫瘤的結果。因此似乎必須將這類的蛋白以抗體或其它的載體(carrier)送入細胞中，才會與 rRNA 結合，發揮其強烈抑制蛋白合成之效果。

伍、結論與建議：

近年來核糖體抑制蛋白(ribosome-inactivating proteins;RIPs)的研究日漸受到重視，特別是分子生物、遺傳工程技術更新的今日，科學家期待對其作用機轉有更清楚的研究，同時定出新發現核糖體抑制蛋白之活化位置(active site)，利用特殊的免疫毒蛋白(immunotoxin)技術，將核糖體抑制蛋白使用在抑癌或抑制 HIV 的用途上。累積多年來科學家的研究經驗，已有初步之成果，但仍有許多未知尚待努力研究發掘。

由準人瓜與蛇瓜中純化分離出的兩種類似 TCS 的第一型核糖體抑制蛋白 — Sechiumin 及 Trichosanthin-S 對抑制非細胞(cell-free)之蛋白合成有相當之效果，但其必須與其它特異的(specific)抗體或載體(carriers)連接，將之送至特定細胞(癌細胞)表面，才能使得這些毒蛋白進入細胞的機率提高，如此才能發揮其毒殺細胞的作用。因此接下來的

重點是與其它特異性的抗體做最佳的連接設計，發展副作用低且專一性高的免疫毒蛋白。

陸、參考文獻

1. Saksena SK, Lau IF: Effects of Prostaglandin-F₂ and a plant protein, trichosanthin on 10-day pregnant rabbits. *Prostaglandins and Medicine* 1980;5:383-7.
2. Wang YF, Zhou WD, Liu JX, et al: Prostaglandin E and F₂ levels in plasma and amniotic fluid during mid-trimester abortion induced by trichosanthin. *Prostaglandins* 1981;22:289-93.
3. Chen X, Ma BL: Trichosanthin, an initiator of the alternative complement activation pathway. *Clin Exp Immunol* 1993;93:248-52.
4. Tsao SW, Ng TB, Yeung HW: Toxicities of trichosanthin and alpha-momorcharin, abortifacient proteins from chinese medicinal plants. On cultured tumor cell lines. *Toxicon* 1990;28:1183-92.
5. Mcgrath MS, Hwang KM, Caldwell SE, et al: GLQ 223 an inhibitor of human immunodeficiency virus replication in acutely and chronically infected cells of lymphocyte and mononuclear phagocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2844-48.
6. Stirpe F, Barbieri L, Battelli MG, et al: Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Bio/Technology* 1992;10:405-12.
7. Endo Y, Mitsui K, Motizuki M, et al: The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28S ribosomal RNA caused by the toxins. *J Biol Chem* 1987;262:5908-12.
8. Vitetta ES, Uhr JW: Immunotoxins. *Ann Rev Immunol*, 1985;3:197-212.
9. Wang QC, Ying WB, Xie H, et al: Trichosanthin-monoclonal antibody conjugate specifically cytotoxic to human hepatoma cells in vitro. *Ca Res* 1991;51:3353-5.
10. Tsao SW, Yan KT, Yeung HW: Selective killing of choriocarcinoma cells *in vitro* by trichosanthin, a plant protein purified from root tubers of the chinese medicinal herb *Trichosanthes kirilowii* *Toxicon* 1986;24:831-40.
11. Anonymous: Treatment of malignant bydatid mole and choriocarcinoma by the combination of trichosanthin and Gleditsia.

- Seln Whole China med Res* 1972;2:13 (in Chinese).
12. Hellmann K, Caster SK: Fundamentals of cancer chemotherapy. McGraw-Hill book company 1987.
 13. Loehrer PJ, Einhorn LH: Drugs five years later: cisplatin. *Annals of Internal Medicine* 1984;100:704-9.
 14. 郭悅雄，林耀堂:台灣天然物化學研究回顧. 科學發展月刊 1986;14:1223-52.
 15. Kuo YH: Natural product research in Taiwan (III). *J Clin Med* 1992;3:19-51.
 16. Barbieri L, Zamboni M, Lorenzoni I, et al: Inhibition of protein synthesis in vitro by proteins from the seeds of *Momordica Charantia* (bitter pear melon) *Biochem J* 1980;186:443-52.
 17. Endo Y, Tsurugi K: RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. *J Biol Chem* 1987;262:8128-30.
 18. Jackson RJ, Hunt T: Preparation and use of nuclease-treated rabbit reticulocyte Lysates for the translation of eukaryotic messenger RNA. *Method Enzymol* 1983;96:50-74.
 19. Wettstein FO, Staehelin T, Noll H: Ribosomal aggregate engaged in protein synthesis: characterization of the ergosome. *Nature* 1963;197:430-5.
 20. Endo Y, Tsurugi K: The RNA-N-glycosidase activity of ricin A-chain. the characteristics of the enzymatic activity of ricin A-chain with ribosomes and with rRNA. *J Biol Chem* 1988;263:8735-39.
 21. Oda T, Aizono Y, Funatsu G: Binding and cytotoxicity of Ricinns communis lectins to Hela cells, sarcoma 180 ascites tumor cells and erythrocyte. *J Biol Chem* 1984;96:377-84.
 22. Armstrong JA: Semi-micro, dye-binding assay for rabbit interferon. *Appl Microbiol* 1971;21:723-5.
 23. Kawata A, Yoshida M, Okazaki M, et al: Establishment of new ACID and nude mouse models of human B liykemia / lymphoma and effective therapy of the tumors with immunotoxin and monoclonal antibody : marked difference between the SCID and nude mouse models in the antitumor efficacy of monoclonal antibody. *Ca Res* 1994;54:2688-94.
 24. Jikil PA, Weiher WJ, Beintema JJ: Use of endopeptidase Lys-c from *Lysobater* enzymogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;69:3506-9.
 25. Heinrikson TL: Application of thermolysin in protein structutal

- analysis. *Method Enzymol* 1977;47:175-89.
26. Lee-Huang S, Kung HF, Huang PL, et al: Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) inhibition, DNA-binding, RNA-binding, and ribosome inactivation activities in the N-terminal segments of the plant anti-HIV protein GAP31. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:12208-12.
 27. Roberts WK, Selitrennikoff CP: Plant proteins that inactivate foreign ribosomes. *Bioscience Reports* 1986;6:19-29.
 28. Stirpe F, Barbieri L: Ribosome-inactivating proteins up to date. *FEBS Lett* 1986;195:1-8.
 29. Maraganore JM, Joseph M, Bailey MC: Purification and characterization of trichosanthin. *J Biol Chem* 1987;262:11628-33.
 30. Bolognesi A, Barbieri L, Carnicelli D, et al: Purification and properties of a new ribosome-inactivating protein with RNA N-glycosidase activity suitable for immunotoxin preparation from the seeds of *Momordica cochinchinensis*. *Biochemica et Biophysica Acta* 1989;993:287-92.
 31. Dallai JA, Irvin JD: Enzymatic inactivation of eukaryotic ribosomes by the pokeweed antiviral protein. *FEBS Lett* 1978;89:257-9.
 32. Casellas P, Dussossoy D, Falasca AI, et al: Trichokirin, a ribosome-inactivating protein from the seeds of *Trichosanthes kirilowii* Maximowicz. *Eur J Biochem* 1988;176:581-8.
 33. Falasca A, Gasperi-campani A, Abbondanza A, et al: Properties of the ribosome-inactivating proteins gelonin, *Momordica charantia* inhibitor, and dianthins. *Biochem J* 1982;207:505-9.
 34. Stirpe F, Olsnes S, Pihl A: Gelonin, a new inhibitor of proteins synthesis, nontoxic to intact cells. *J Biol Chem* 1980;255:6947-53.
 35. Lee-Huang S, Huang PL, Lung HF, et al: TAP-29: An anti-human immunodeficiency virus protein from *Trichosanthes kirilowii* that is nontoxic to intact cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:6570-4.
 36. Roberts WK, Stewart TS: Purification and properties of a translation inhibitor from wheat germ. *Biochem* 1979;18:2615-21.

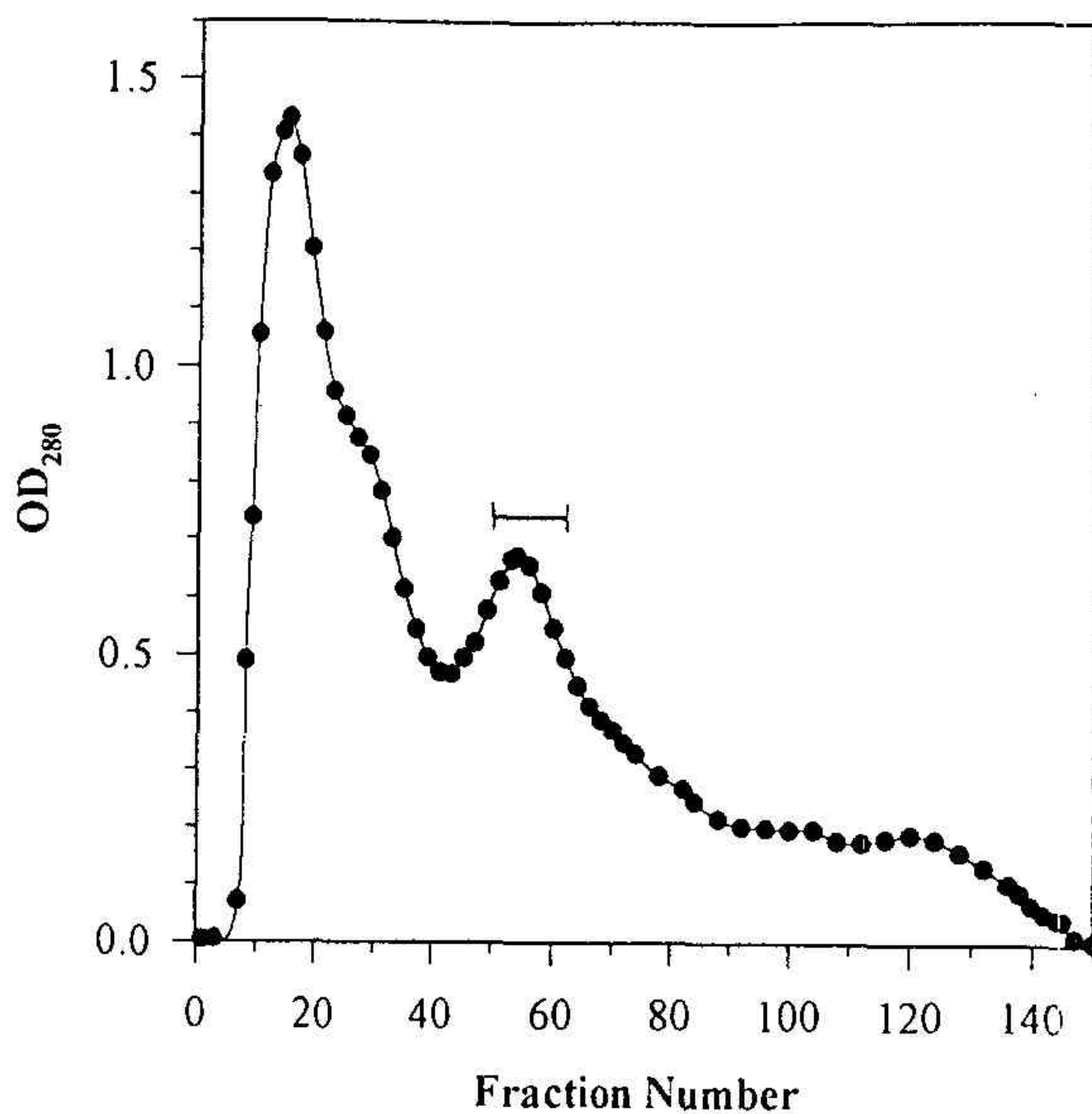


Fig 1. Gel filtration of sechiumin on a Sephadex G-75 column. The crude extracts were applied on a Sephadex G-75 column (1.8 x 90 cm) pre-equilibrated with 0.01M sodium acetate buffer, pH 5.0, and eluted with the same buffer. Fractions (5.0 ml) were collected and the absorbance at 280 nm was measured. Activities were measured by their effects on protein biosynthesis by using rabbit reticulocyte lysate and the active fractions were indicated by the horizontal bar.

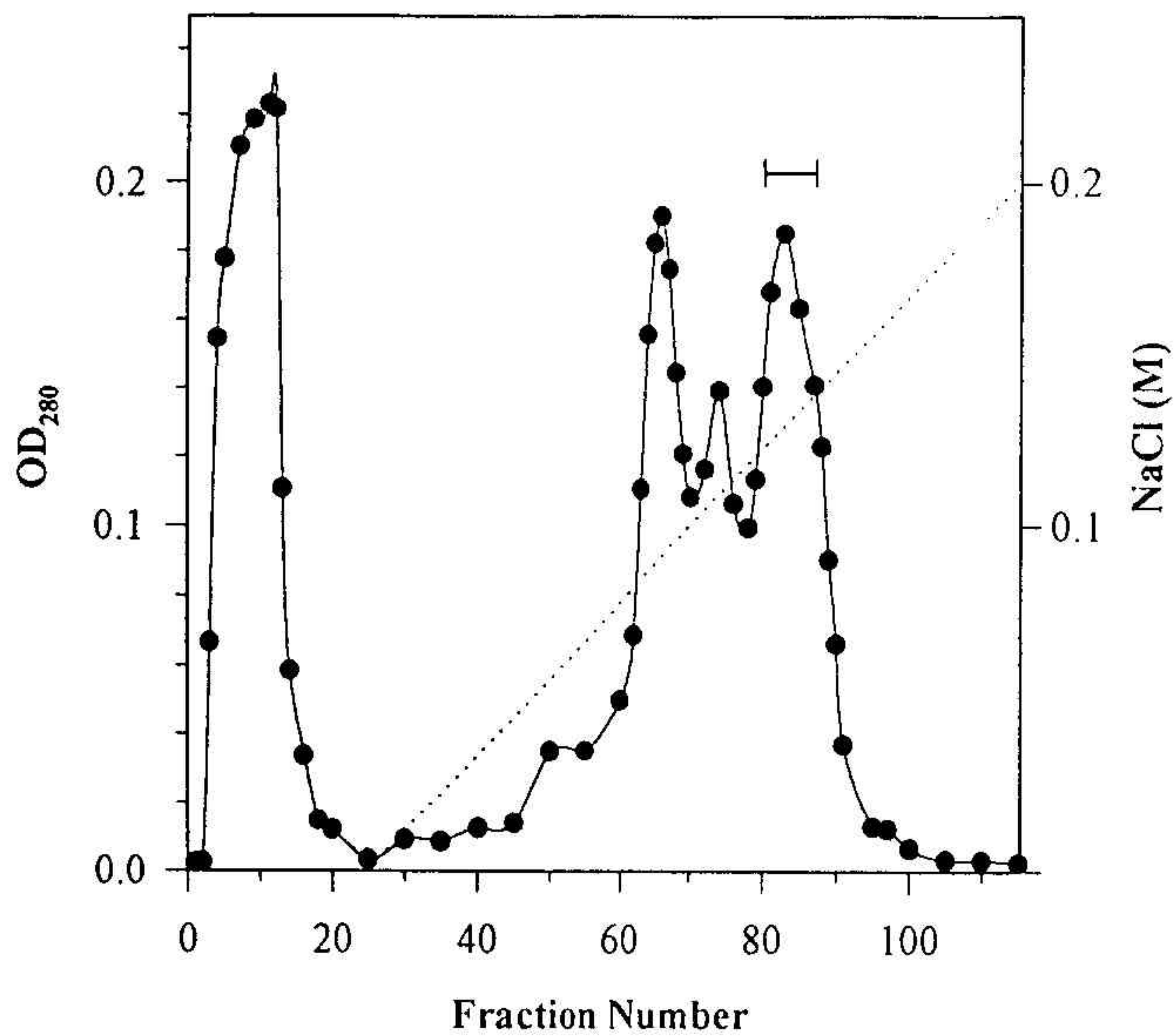


Fig 2. CM-52 cellulose chromatography of sechiumin. CM-52 cellulose column (6 x 3.3 cm) was pre-equilibrated with 0.01M sodium acetate buffer, pH 5.0. The column was washed with 100 ml of the same buffer and the bound protein was eluted with a 300 ml linear gradient from 0 to 0.2 M NaCl in the same sodium acetate buffer. Fractions (2.5 ml) were collected and the absorbance at 280 nm was measured. The inhibitory activity was indicated by horizontal bar. Absorbance at 280 nm (—●—●—); NaCl gradient (.....).

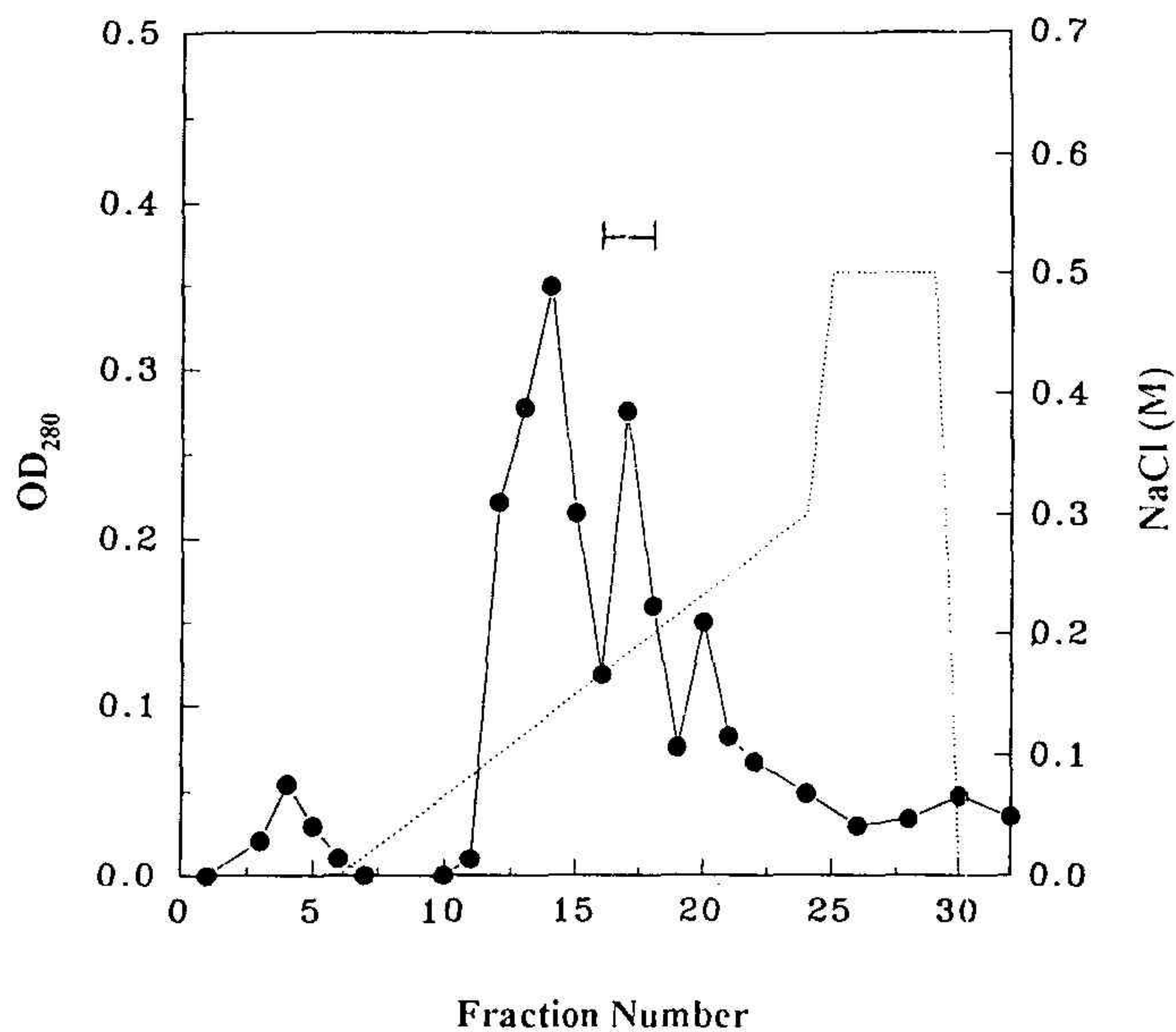


Fig 3. FPLC Mono S chromatography of sechiumin. The binding proteins were eluted with a linear gradient from 0 to 0.5 M NaCl in the sodium acetate buffer, pH 5.0. Fractions (1 ml) were collected and the absorbance was measured at 280 nm. The inhibitory activity was measured and the active fractions were indicated by horizontal bar. Absorbance at 280 nm (●—●); NaCl gradient (.....).

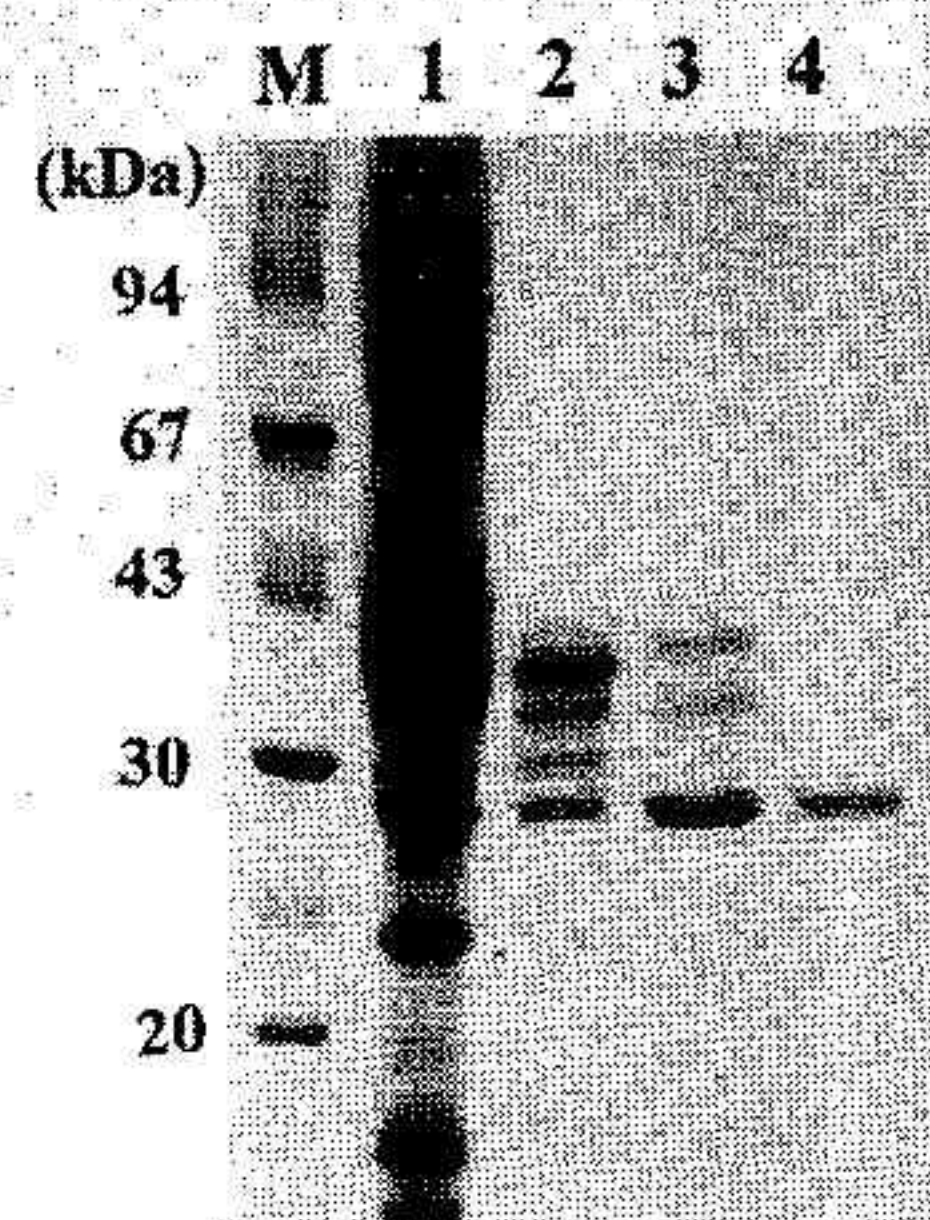


Fig. SDS/PAGE analysis of proteins at various steps of purification. Electrophoresis was carried out on 12.5% SDS/PAGE . M: molecular weight markers; Lane 1: crude extract before applied to Sephadex G-75; Lane 2: active fraction from Sephadex G-75 ; Lane 3: active fraction from CM-52 cellulose; Lane 4: active fraction from FPLC Mono S.

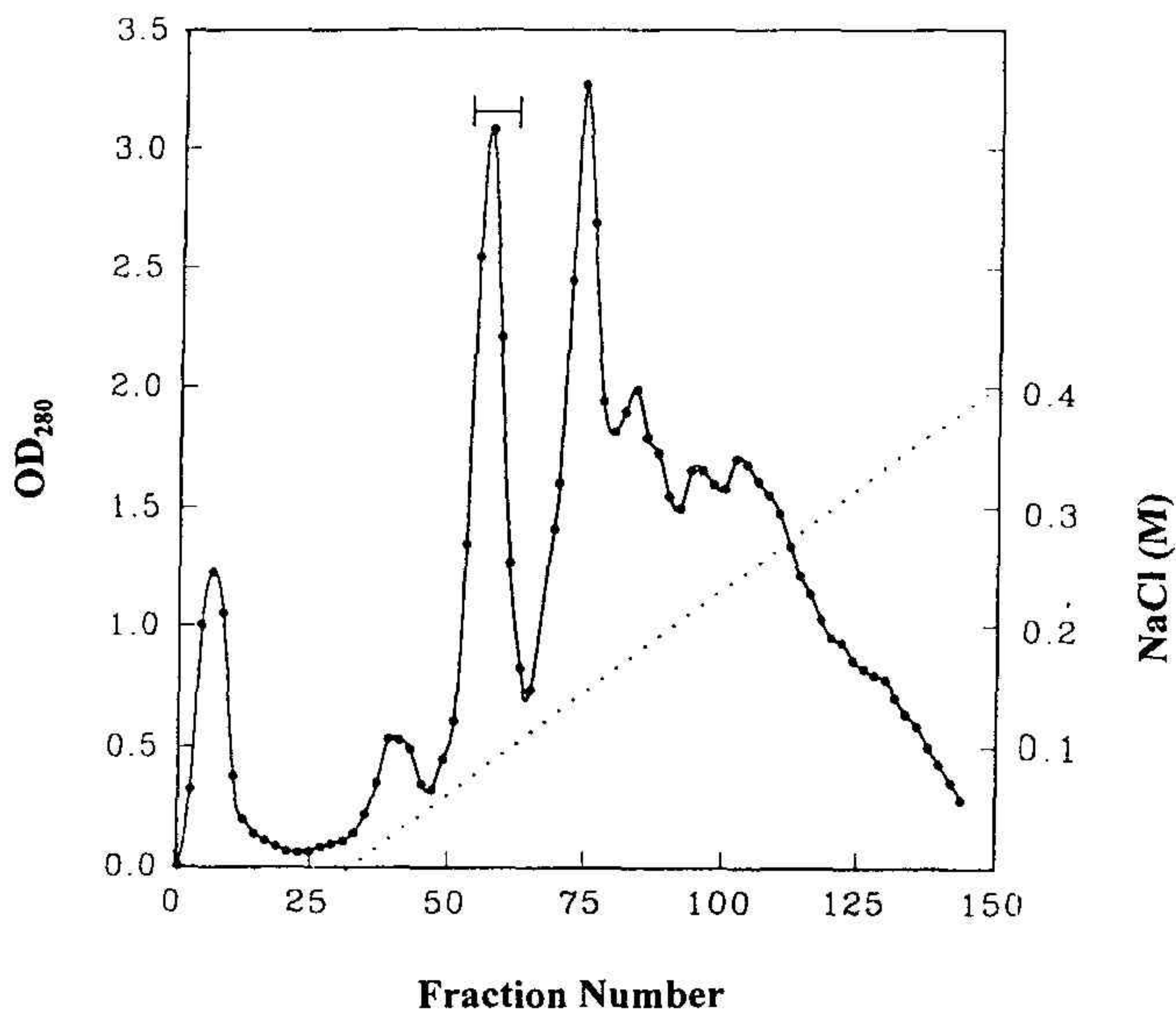


Fig 5. CM-52 cellulose chromatography of trichosanthin-s. Fractions which were active in the inhibition of protein synthesis were collected from the DEAE cellulose column and applied to a CM-52 cellulose column (7 x 3.5 cm) pre-equilibrated with 0.01 M sodium acetate buffer, pH 5.0. The column was washed with 200 ml of the same buffer and the bound proteins were eluted with a 300 ml linear gradient from 0 to 0.4 M NaCl in the same sodium acetate buffer. Fractions (3.5 ml) were collected and the absorbance at 280 nm was measured. The inhibitory activity was indicated by horizontal bar. Absorbance at 280 nm (• • •); NaCl gradient ().

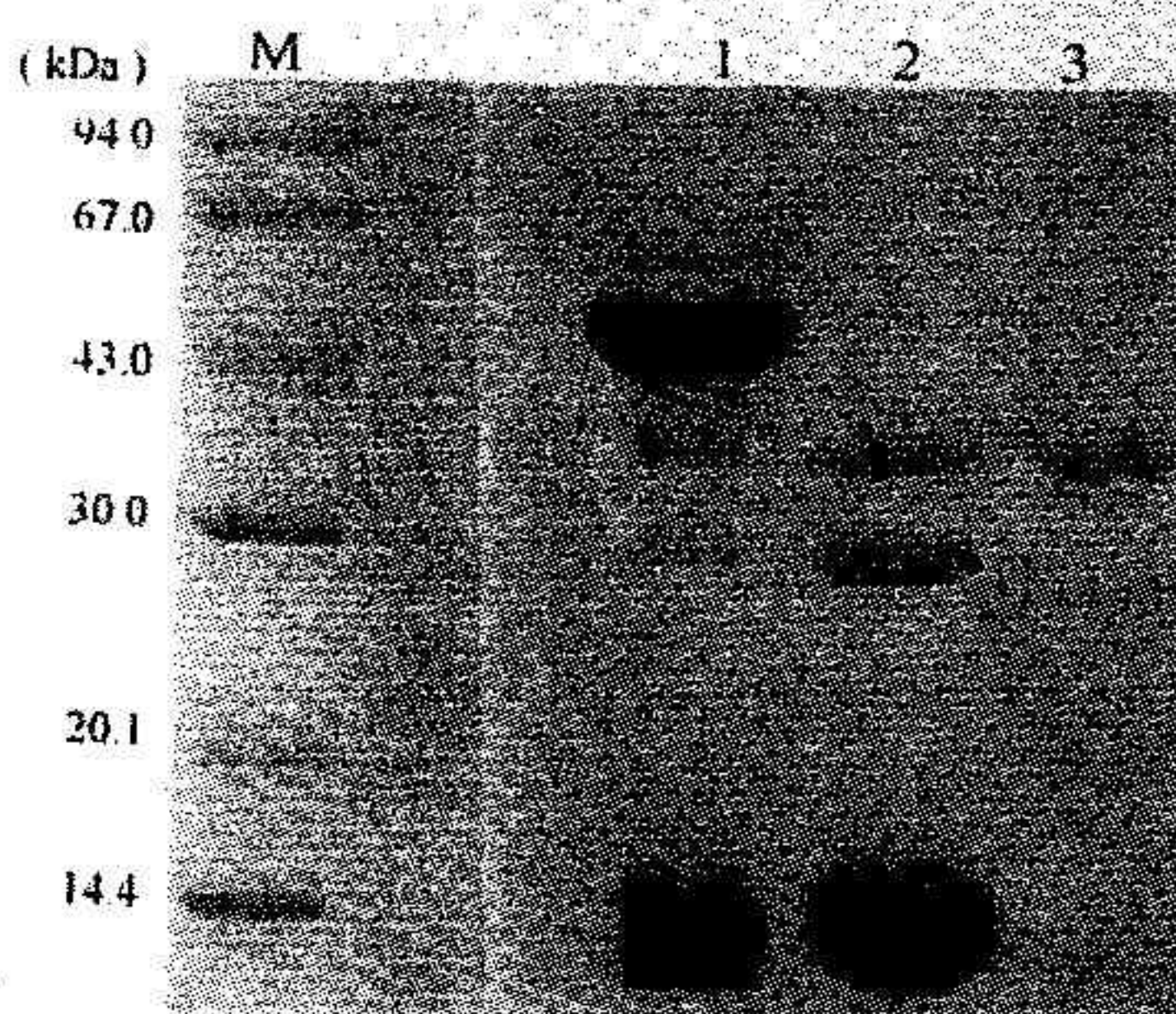


Fig 6. SDS/PAGE analysis of proteins at various steps of purification. Electrophoresis was carried out on 12.5% SDS/PAGE . M: molecular weight markers; Lane 1: crude proteins before applied to DEAE cellulose column ; Lane 2: active fraction from DEAE unbound fraction ; Lane 3: active fraction from CM-52 cellulose.

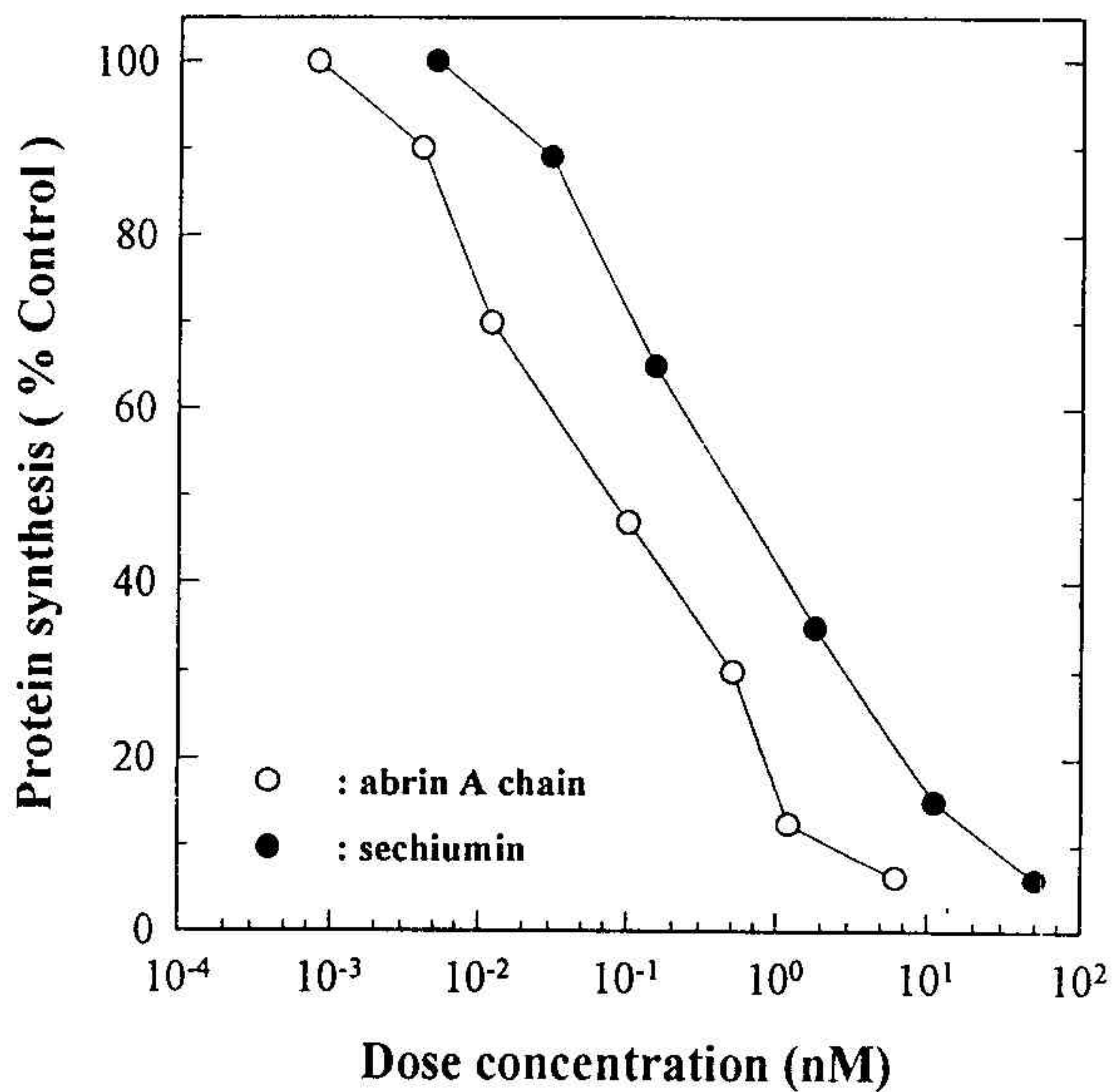


Fig 7. Effect of sechiumin on protein synthesis by a rabbit reticulocyte lysate. Rabbit reticulocyte lysate was incubated with various concentrations of sechiumin or abrin A chain for 15 min at 30°C in an assay mixture containing [³H]-leucine, and the amounts of [³H]-leucine incorporated were measured with a Beckman scintillation counter 5801.

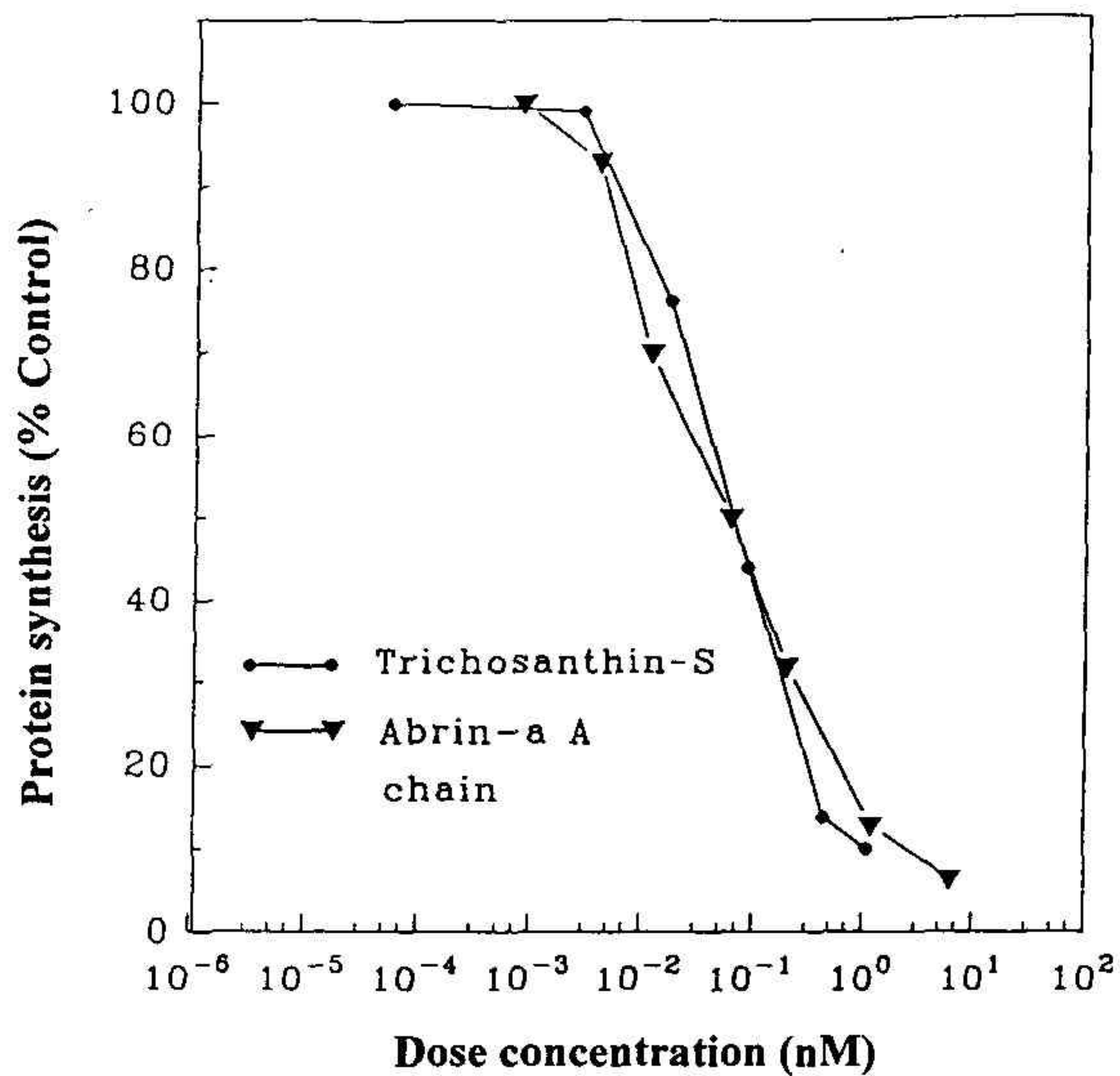


Fig 8. Effect of trichosanthin-s on protein synthesis by a rabbit reticulocyte lysate. Rabbit reticulocyte lysate was incubated with various concentrations of sechiumin or abrin A chain for 15 min at 30°C in an assay mixture containing [3 H]-leucine , and the amounts of [3 H]-leucine incorporated were measured with a Beckman scintillation counter 5801.

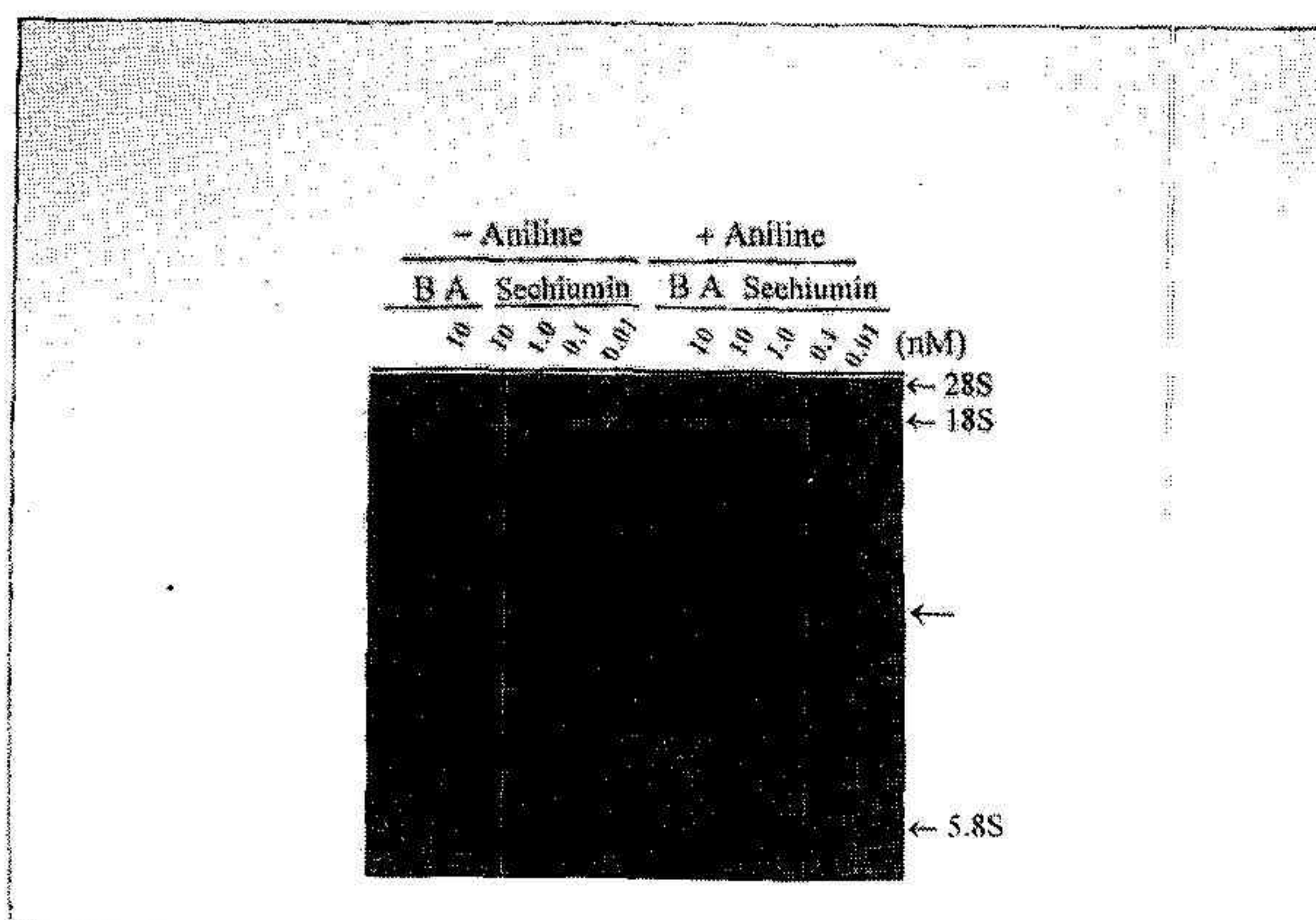


Fig 9. Analysis by gel electrophoresis of aniline-treated rRNA from sechiumin-treated rat liver. Rat liver ribosomes were treated with serial dilutions of sechiumin. Extracted RNAs from those ribosomes were treated with aniline and analyzed by 7 M urea/acrylamide gel electrophoresis at 25 mA for 2h. The arrow indicated the fragment split by aniline from rRNA of toxin-treated ribosomes. B: no toxin-treated liver ribosomes; A: abrin A chain-treated liver ribosomes.

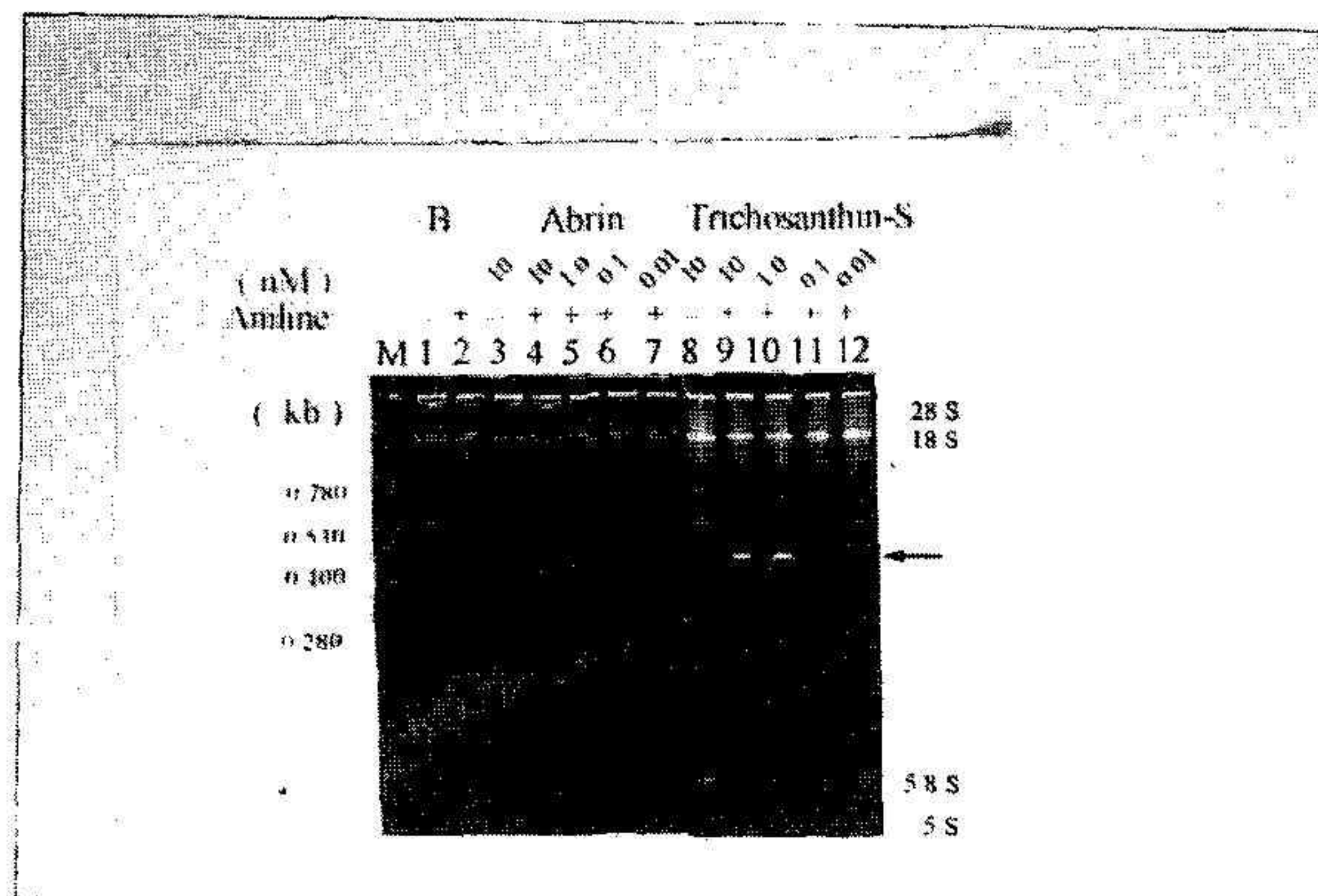


Fig 10. Analysis by gel electrophoresis of aniline-treated rRNA from trichosanthin-s treated rat liver. Rat liver ribosomes were treated with serial dilutions of trichosanthin-s. Extracted RNAs from those ribosomes were treated with aniline and analyzed by 7 M urea/acrylamide gel electrophoresis at 25 mA for 2h. The arrow indicated the fragment split by aniline from rRNA of trichosanthin-s treated ribosomes. B : no toxin-treated liver ribosomes.

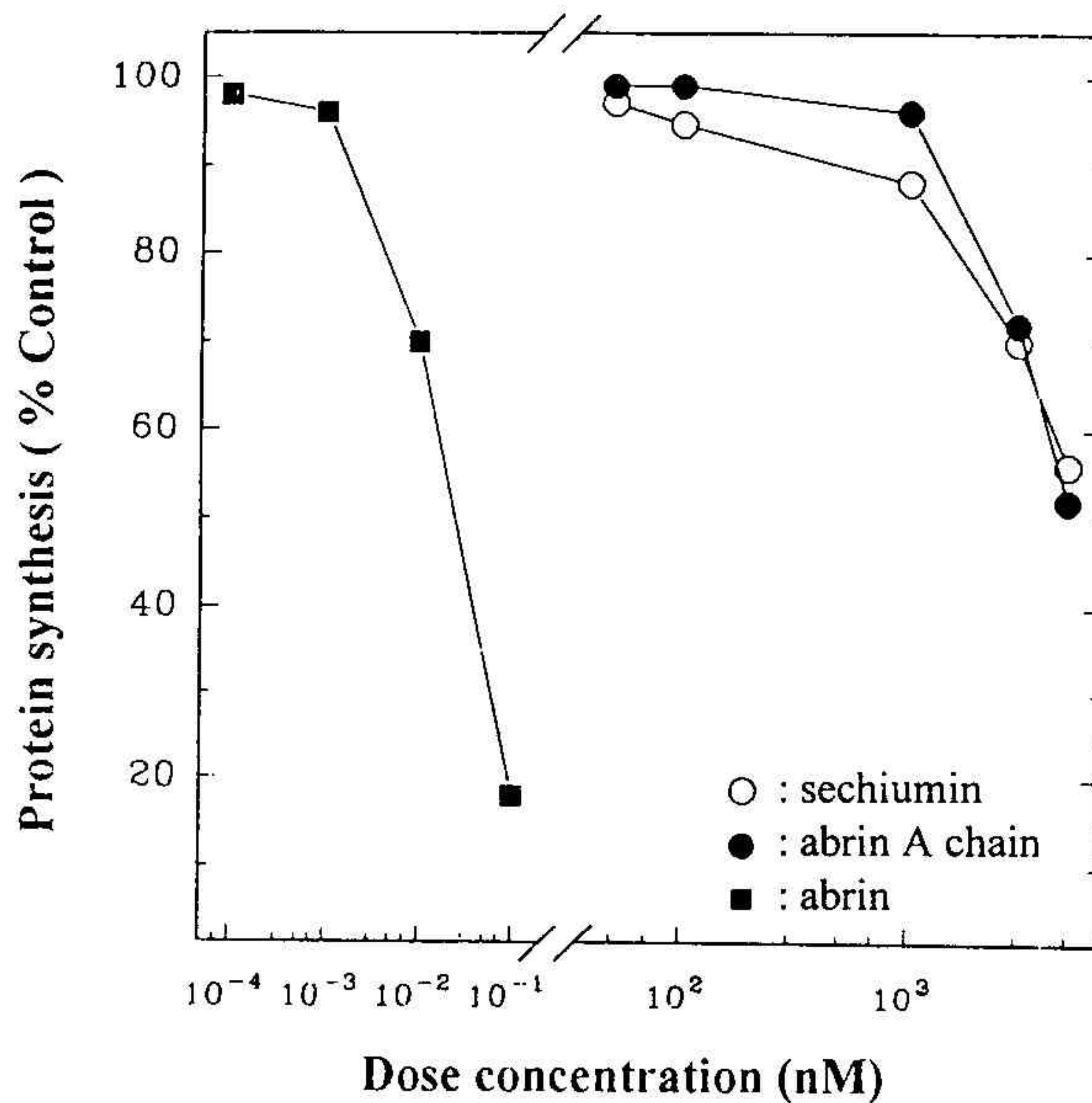


Fig 11. Cytotoxicity of sechiumin against HeLa cells. HeLa cells were cultured in medium RPMI 1640 containing 10% FBS and various concentrations of sechiumin or abrin A chain in a 24-well microtest plate in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 37°C for 4h. After 4h culture, cells were changed medium with Leu-free RPMI 1640 containing [³H]-Leu and continued to culture at the same condition for 1h. Then, the amounts of [³H]-Leu incorporated were measured with a Beckman scintillation counter 5801.

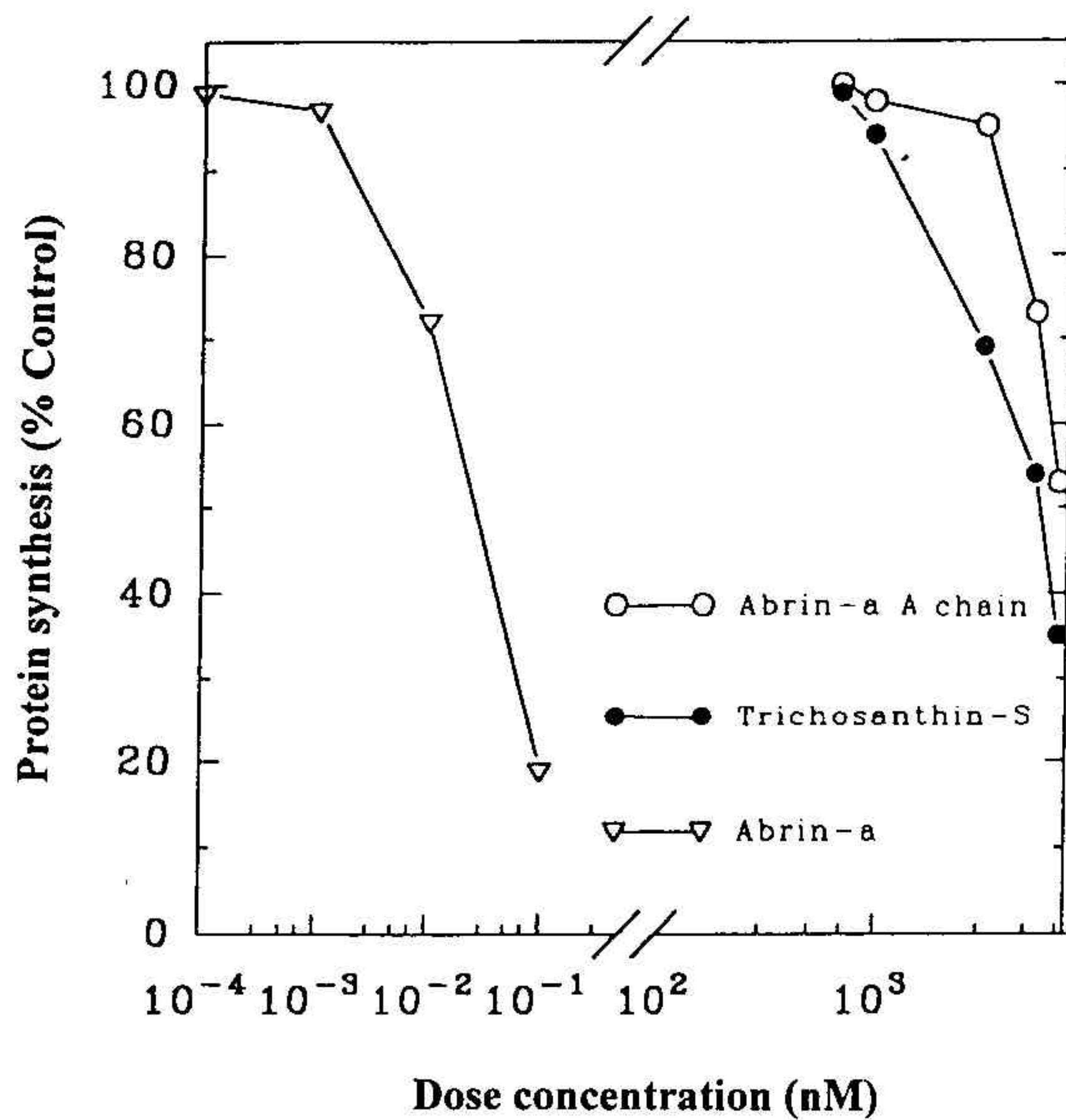


Fig12. Cytotoxicity of trichosanthin-s against HeLa cells. HeLa cells were cultured in medium RPMI 1640 containing 10% FBS and various concentrations of trichosanthin-s or abrin A chain in a 24-well microtest plate in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 37°C for 4h. After 4h culture, cells were changed medium with Leu-free RPMI 1640 containing [³H]-Leu and continued to culture at the same condition for 1h. Then , the amounts of [³H]-Leu incorporated were measured with a Beckman scintillation counter 5801.

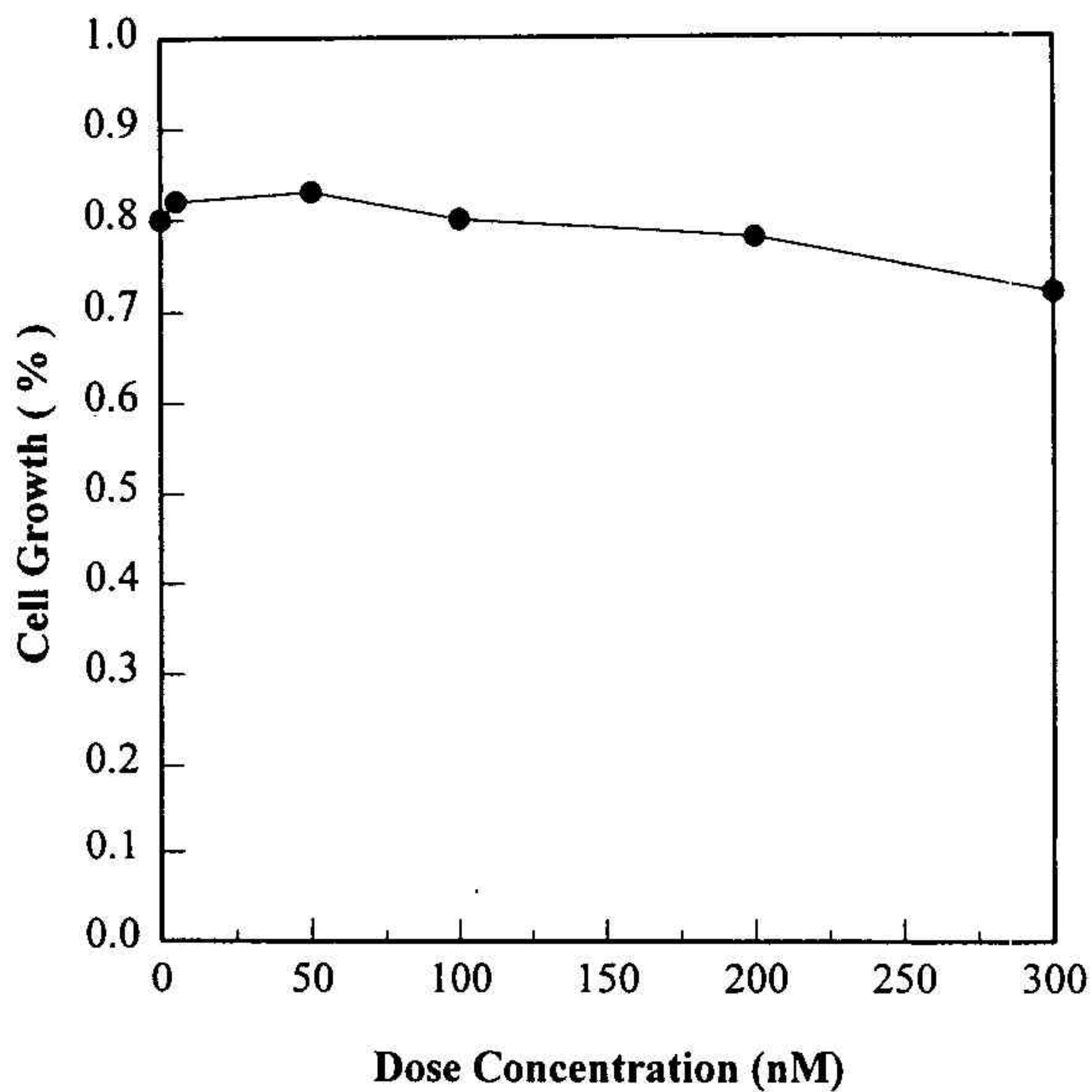


Fig 13. Effect of sechiuimin on growth of HeLa cells. Hela cells were cultured in MEM containing 10% FBS and various dilutions of sechiuimin in a 96-well microtest plate in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 37 oC for 24 h. The cells were stained with staining reagent (0.5% methylrosaniline chloride; 0.85% NaCl; 5% formamide; 50% ethanol) and absorbance at 540 nm was measured with a microplate photometer.

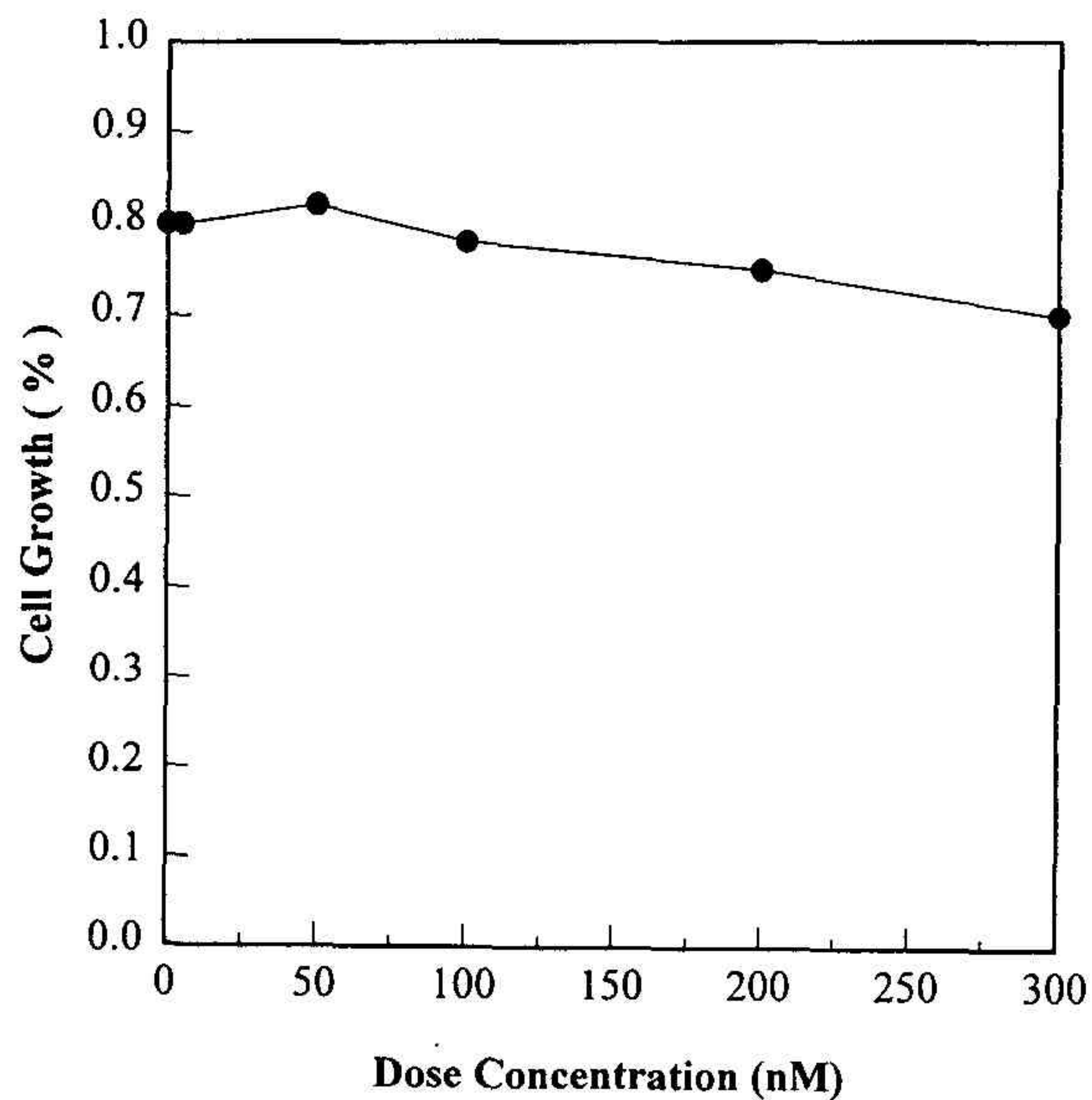


Fig 14. Effect of trichosanthin-s on growth of HeLa cells. Hela cells were cultured in MEM containing 10% FBS and various dilutions of trichosanthin-s in a 96-well microtest plate in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 37 °C for 24 h. The cells were stained with staining reagent (0.5% methylrosaniline chloride; 0.85% NaCl; 5% formamide; 50% ethanol) and absorbance at 540 nm was measured with a microplate photometer.

Table 1. Purification of sechiumin from 400g *Sechium edule* Swartz

Purification of Sechiumin

Fraction	Protein (mg)	Activity (units ^a x 10 ⁻⁶)	Specific activity (units/mg x 10 ⁻⁴)
1 Crude extract	690	—	—
2. Sephadex G-75	262	3.14	1.2
3 CM-52 Cellulose	12.2	2.44	20
4 FPLC Mono-S	3.1	2.04	66

^a One unit is defined as the amount of protein necessary to inhibit protein synthesis by 50% in 0.025 ml rabbit reticulocyte lysate reaction mixture.

Table 2. Purification of trichosanthin-s from the seeds of *Trichosanthes anguina*.

Purification of Trichosanthin-S^a

Fraction	Protein (mg)	Activity (units* x 10 ⁻¹¹)	Specific activity (units/mg x 10 ⁻¹⁴)
1.Crude extract	-	16	-
2.DEAE Cellulose	560	10	17.8
3. CM -52 Cellulose	45	7	156.0

*One unit is defined as the amount of protein necessary to inhibit protein synthesis by 50% in 0.025 ml rabbit reticulocyte lysate reaction mixture.

^a : 500 g of seeds was used.

- : Contaminated with color-substance(s)

Table 3. Inhibition of growth of HeLa cells in nude mice by intralesional treatment with Sechiumin

Treatment dose (μg)	Tumor size (mm^2)	Inhibition of tumor growth (%)
0	90.4	-
10	63.8	31.1
50	62.1	31.3
500	51.3	44.3
1000	45.2	50.0

2×10^5 HeLa cells were inoculated subcutaneous into each nude mouse. Four days after tumor inoculation, they were given intralesional treatment every four days for two weeks in the doses indicated. Twenty days after, tumor size was measured and the tumors were expressed as the mean obtained from length (mm) $\times$ width (mm) of the solid tumors. Each value represents the mean of 3 mice.

Table 4. Inhibition of growth of HeLa cells in nude mice by intralesional treatment with Trichosanthin-S

Treatment dose (μg)	Tumor size (mm^2)	Inhibition of tumor growth (%)
0	92.4	-
10	63.7	31.1
50	60.4	34.7
500	50.2	45.7
1000	48.8	47.2

2×10^5 HeLa cells were inoculated subcutaneous into each nude mouse. Four days after tumor inoculation, they were given intralesional treatment every four days for two weeks in the doses indicated. Twenty days after, tumor size was measured and the tumors were expressed as the mean obtained from length (mm) $\times$ width (mm) of the solid tumors. Each value represents the mean of 3 mice.

Table 5. Amino acid composition of sechiumin and trichosanthin-s

Amino acid	Composition (mol. / mol. prot.)	
	Sechiumin	Trichosanthin-S
Asx	23.0 (23)	29.0 (29)
Thr	17.9 (18)	20.9 (21)
Ser	23.2 (23)	23.2 (23)
Glx	21.3 (21)	26.2 (26)
Pro	9.8 (10)	11.6 (12)
Gly	19.2 (19)	19.4 (19)
Ala	24.3 (24)	29.9 (30)
Cys	0.0 (0)	0.0 (0)
Val	31.2 (31)	23.0 (23)
Met	3.0 (3)	3.0 (3)
I l e	16.9 (17)	15.7 (16)
Leu	23.2 (23)	24.8 (25)
Tyr	12.0 (12)	15.2 (15)
Phe	12.1 (12)	17.8 (18)
His	3.2 (3)	4.0 (4)
Lys	10.8 (11)	14.6 (15)
Arg	11.2 (11)	11.2 (11)
Trp	2.0 (2)	1.0 (1)
Total	264	291

	1	10	20																																				
SEC	D	I	N	F	N	L	L	G	G	T	G	A	T	Y	K	Q	F	I	K	N	L	R	T	T	L	T													
TRI-S	D	V	S	F	R	L	S	G	A	T	S	S	S	Y	G	V	F	I	S	N	L	R	K	A	L	P													
TCS	D	V	S	F	R	L	S	G	A	T	S	S	S	Y	G	V	F	I	S	N	L	R	K	A	L	P													
RIC	I	F	P	K	Q	Y	P	I	I	N	F	T	T	A	G	A	T	V	Q	S	Y	T	N	F	I	R	A	V	R	G	R	L	T						
RCA	I	F	P	K	Q	Y	P	I	I	N	F	T	T	A	D	A	T	V	E	S	Y	T	N	F	I	R	A	V	R	S	H	L	T						
ABR	E	D	R	P	-	I	K	F	S	T	E	G	A	T	S	Q	S	Y	K	Q	F	I	E	A	L	R	E	R	L	R									
LUF-a	D	V	R	F	S	L	S	G	S	S	S	T	S	Y	S	K	F	I	G	D	L	R	K	A	L	P													
LUF-b	A	N	V	S	F	S	L	S	G	A	D	S	K	S	Y	S	K	F	I	T	A	L	R	K	A	L	P												
MOM	D	V	S	F	R	L	S	G	A	D	P	R	S	Y	G	M	F	I	K	D	L	R	N	A	L	P													
PAP	I	N	T	I	T	F	D	A	G	N	A	T	I	N	K	Y	A	T	F	M	E	S	L	R	N	E	A	K											
MAP	A	P	T	L	E	T	I	A	L	S	D	L	N	N	P	T	T	Y	L	S	F	I	T	N	I	R	T	K	V	A									
SAP	V	T	S	I	T	L	D	L	V	N	P	T	A	G	Q	Y	S	S	F	V	D	K	I	R	N	N	V	K											
BAR	A	A	K	M	A	K	N	V	D	K	P	L	F	T	A	T	F	N	V	-	Q	A	S	S	A	D	Y	A	T	F	I	A	G	I	R	N	K	L	R

Table 6. N-terminal sequence comparsion of sechiumin (SEC), trichosanthin-s (TRI-S) trichosanthin (TCS), ricin A-chain (RIC), *Ricinus communis* agglutinin (RCA), abrin-a A chain (ABR), luffin-a (LUFa) luffin-b (LUFb), momordin (MOM), pokeweed antiviral protein-S (PAP), *Mirabilis* antiviral protein (MAP), saporin (SAP) and barley translation inhibitor (BAR).

