

动物抗菌肽的研究进展

陈慧芸 (厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室, 福建厦门 361005)

摘要 综述了动物抗菌肽的来源和种类, 探讨了其在药品、食品以及转基因动植物中的应用前景。

关键词 抗菌肽; 防御素; 来源; 应用前景

中图分类号 S859.79·7 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)08-03242-02

Research Progress of Antibacterial Peptide From Animals

CHEN Hui-yun (State Key Laboratory of Marine Environmental Science, College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005)

Abstract The types and the antimicrobial activities of animal antibacterial peptides were summarized, and its application in medicine, food and transgenic livestock and plants was discussed.

Key words Antimicrobial peptides; Defensins; Source; Application

抗菌肽是基因编码的肽类抗菌分子, 是生物机体在抵御病原微生物的防御反应中所产生的一类抗微生物与一些恶性细胞的短肽。由于这类多肽具有广谱高效杀菌活性, 因而最初被命名为“antibacterial peptides, ABP”, 译为抗菌肽。它们不仅对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌有较强的杀灭作用, 对某些真菌、原生动植物, 尤其是对耐药性细菌也具有杀灭作用, 极有可能成为一种高效、低毒且无残留危害的抗菌、抗病毒、抗癌新药, 甚至可以通过基因工程的方法将抗菌肽基因导入植物、动物和微生物体内, 用于大批量生产或进行动植物的抗病育种^[1]。

1972年, 瑞典科学家 Boman 等首先在果蝇中发现抗菌肽及其免疫功能。Steiner 等人于 1981 年研究了来自天蚕蛹的抗菌多肽 cecropins^[2], 该肽在昆虫天然免疫中发挥着重要的作用, 它也被认为是第 1 个真正意义上的抗菌肽。随后, 人们又在细菌、真菌、两栖类、哺乳动物、植物和人类中相继发现并分离得到了抗菌肽。为此, 笔者就动物抗菌肽的来源和种类及应用前景进行了综述。

1 动物抗菌肽的来源和种类

到目前为止, 许多种抗菌肽已被鉴定出来, 并且其数量每年都以很高的速度增长, 最新数据可以在国际上最权威的抗菌肽数据 (<http://www.bbcm.units.it/~tossi/>) 中查询。这些抗菌肽来自脊椎动物、无脊椎动物、植物、微生物和人类, 其中来自昆虫、节肢动物、蟾蜍等生物的居多^[3]。

1.1 哺乳动物抗菌肽 防御素 Defensins (α -Defensins 和 β -Defensins) 是哺乳动物中研究最多的一类抗菌肽^[4-5]。它们都有 3 个二硫键稳定的 β -片层结构, 但在氨基酸数量、Cys 的连接位置及各自的保守序列、氮端与碳端空间上的距离、体内分布等方面有区别。 α -Defensins 由 29~35 个氨基酸残基组成, 存在于人、猴和某些啮齿类动物的嗜碱性粒细胞和巨噬细胞中。 β -Defensins 由 38~42 个氨基酸残基组成, 在研究涉及的所有哺乳动物中均可表达 β -Defensins, 其被表达于器官的被覆上皮, 在呼吸道的自身防御中起重要作用。Cathelicidins 也是哺乳动物中一大类抗菌肽。Cathelicidins 是一类 N-端有一段 cathelin 结构域而 C-端含有高度特异的

成熟肽段的抗微生物肽家族^[6]。猪的 protegrins、绵羊的 SMAP229、牛的 BMAP227 和 BMAP228 等都是嗜中性细胞中含有的 cathelicidins^[7-9]。哺乳动物中其他抗菌肽如 Hecpudin 是近年来发现的一类富含半胱氨酸、具有二硫键结构的性质独特的多肽。Krause 等人首先从人血液中分离纯化了这一多肽, 称之为肝脏表达的抗菌多肽 (LEAP1)^[10]。

1.2 水产动物抗菌肽 对水产动物抗菌肽的研究相对比较晚。Park 等分离得到 Parasin I, 分子量为 2000.4 Da, 氨基酸序列与组蛋白 Histone 2A 的 N-端完全相似^[11]。Oren 等从豹蝎 (Paradachirus marmoratus) 中分离到 1 种 33 个氨基酸残基的抗菌肽, 命名为 pardaxin, 其结构特点为螺旋-卷曲-螺旋, 研究发现它能选择性作用于细菌膜, 具有比蜂毒素更强的抗菌活性和更低的人红细胞溶血活性^[12]。1997 年, Cole 等从美洲拟蝶中得到 pleurocidin, 它包含 25 个氨基酸残基, 具有两亲性 α -螺旋结构; 成熟肽中含有 4 个赖氨酸, 有助于结合细菌细胞膜的结合, 对革兰氏阳性、阴性细菌都有抑制作用^[13]。Lauth 等从杂交斑纹鲈鱼皮肤、鳃及血液中分离得到 moronecidin, 该抗菌肽有 22 个氨基酸残基, 表现出较强的阳离子特性, 可形成两亲性的 Q-螺旋结构^[14]。1996 年, Schnapp 等首先从青园蟹 (Carcinus aenas) 的血细胞中分离得到 3 种具有杀菌作用的肽, 其中分子量为 6.5kDa 的抗菌肽富含脯氨酸^[15]。Relf 等从岸蟹 (Carcinus maenas) 颗粒细胞中分离到 1 种 11.5 kDa 的抗菌肽^[16]。2006 年, 王克坚等从锯缘青蟹 (Scylla serrata) 雄性生殖腺中分离纯化获得 1 种新抗菌肽, 命名为 scygonadin。该基因是甲壳动物中第 1 个被鉴定为主要在雄性生殖腺中特异性转录表达的抗菌肽基因, 分子量约为 10.8 kDa, 等电点 PI 为 6.09, 为阴离子抗菌肽; 同时还发现, scygonadin 基因仅在雄性生殖腺、并限于性成熟锯缘青蟹的射精管中高效表达, 具有抗革兰氏阳性菌和阴性菌的作用^[17-18]。

1.3 昆虫动物抗菌肽 20 世纪 70 年代初, 瑞典科学家 Boman 等首先从惜古比天蚕 (Hyalophora cecropia) 中获得抗菌肽并确定了天蚕素 A 和 B 的一级结构顺序^[19]。此后在许多昆虫中也鉴定出有 cecropins 的类似分子。Lee 等在猪肠中也发现该类抗菌肽^[20]。Cecropins 一般含有 35~39 个氨基酸残基, 为一线形阳离子肽, 一般不含半胱氨酸, 对各种大肠杆菌和其他 G-菌如沙门氏菌具有很强的活性, 对某些 G+菌

基金项目 厦门大学资助项目。

作者简介 陈慧芸 (1980-), 女, 福建漳浦人, 硕士, 从事分子生物学研究。

收稿日期 2007-12-21

也有杀伤活性,但对霉菌和其他真核细菌无细胞毒性作用。Cecropins 是目前已知天然抗菌肽中活力最强的一种^[21]。

2 抗菌肽的应用前景

大量抗生素的使用使得致病菌的耐药性大大提高,人们的健康受到了严重的威胁,迫切需要找到一条解决抗生素问题的有效途径。抗菌肽具有广谱抗细菌、真菌、病毒、原虫和抗肿瘤功能及独特的作用机理,极有可能成为抗菌、抗病毒以及抗肿瘤药物的新来源,有广阔的应用前景^[22]。

抗菌肽的最早临床研究也是从局部感染治疗开始。细菌素 MSI 78 及 IB 367 都已进入临床试验阶段。BPI 是人嗜中性粒细胞抗菌蛋白的衍生物,它作为一种注射药物已进入临床 III 期试验阶段,对脑膜炎奈瑟球菌疗效特别显著。表 1 列出了正在研制的部分抗菌肽^[23]。

表 1 药品开发公司及正在研制的部分抗菌肽

Table 1 Drug development company and partial antimicrobial peptide under development

公司名称 Company name	抗菌肽 Antimicrobial peptide	适应症 Indications
Magainin 制药公司	Peiganan	溃疡
	MSI-99	抗菌药、抗癌药
Micrologix 生化技术公司	MBI594AN	粉刺
	MBI226	导管脓毒症
Intrabiotics 公司	Iseganan	黏膜炎
Xoma 公司	Neuprex	脑膜炎
Demegen 公司	P-133	口腔念珠菌病
Cubist 制药公司	Daptomycin	脓血症
AM 公司	Lactofenacin-B	抗真菌药
Entomed 公司	Heliomycin	抗菌药
TriPep 公司	GPG	HIV
Trimeris 公司	Enfuvirtide (T20)	HIV

近年来,关于抗菌肽转基因动植物方面的研究也有了较大的突破。Reed 等将 Shiva 1a 基因转入小鼠,发现明显增加了小鼠对布鲁氏杆菌病的抵抗能力^[24]。Osusky 等将 N 末端修饰过的 temporin A 基因导入马铃薯中,获得的转基因植株能提高对早疫病和晚疫病的抗性,转基因茎块的储藏时间超过 2 年不受病害,对软腐病菌也有抵抗力^[25]。贾士荣等将 cecropin B、shiva A 的单价基因及 cecropin B/shiva A 双价基因导入马铃薯中,获得转基因植物的青枯病发病延迟,病情指数下降,植株死亡率降低。在进行接种青枯病菌试验中,筛选得到了 3 个比原始品种抗病性提高 1~3 级、达到中抗的株系^[26]。

而在食品应用方面,抗菌肽是一种极有前途的新型食品防腐剂。细菌素作为食物防腐剂,在多个国家得到广泛使用,而且还被美国食品与药品管理局批准为血液防腐添加剂。抗菌肽作为饮料的防腐剂,有良好的溶解性和稳定性^[27]。

3 结语

抗菌肽与人类生活的关系越来越密切,抗菌肽的市场开发前景必将更为广阔。但是关于抗菌肽临床应用的研究还有很多问题需要解决,如抗菌肽基因数量太少,来源困难,费用昂贵,抗真菌机理不清楚,表达效率不高等问题。虽然抗菌肽研究的应用仍存在着许多问题,但应该相信随着对抗菌肽不断深入的研究,抗菌肽将在生活的各个方面发挥更加重要的作用。

参考文献

[1] 梁永利.天然抗菌肽的来源及分类[J].安徽农业科学,2006,34(18):4728-4734.
[2] REDDY K V,YEDERY R D,ARANHA C. Antimicrobial peptides:

Premises and promises [J]. Int J Antimicrob Agents,2004,24(6):536-547.
[3] SERGIO H,MARSHALL. A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology [J]. Electronic Journal of Biotechnology,2003,6(3):262-275.
[4] 布冠好,李宏基,杨国宇,等.抗菌肽的作用特点及应用前景[J].动物医学进展,2005,26(3):26-28.
[5] MILLAR R P,LU Z L,PAWSON A J,et al.Gonadotropin-releasing hormone receptors[J]. Endocr Rev,2004,25(2):235-275.
[6] RITONJA A,KOPITAR M,JERALA R,et al. Primary structure of a new cysteine proteinase inhibitor from pig leukocytes [J]. FEBS Lett,1989,255:211-214.
[7] KOKRYAKOV V N,HARWOIG S S,PANYUTICH E A,et al. Protegrins:Leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins [J].FEBS Lett,1993,327(2):231-236.
[8] SKERLAVAJ B,BENINCASAM,RISSO A,et al. SMAP229:A potent antibacterial and antifungal peptide from sheep leucocytes [J]. FEBS Lett,1999,463:58.
[9] RISSO A,BRAIDOT E,SORDANOM C,et al.BMAP228,an antibiotic peptide of innate immunity,induces cell death through opening of the mitochondrial permeability transition pore [J].Mol Cell Biol,2002,22(6):1926-1935.
[10] KAVSE A,MAGERT H J,LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity[J]. FEBS Letters,2008,480:147-150.
[11] PARK I Y,PARK C B,KIM M S,et al. Parasin I,an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, Parasilurus asotus[J]. FEBS Lett,1998,437:258-262.
[12] QREN Z,SHAI Y. A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin:A pore-forming peptide isolated from mosos sole fish Pardachirus maroratus[J].European Journal of Biochemistry,1996,237:303-310.
[13] COLE A M,WEIS P,DIAMOND G. Isolation and characterization of pleurocidin,an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder [J]. J Biol Chem,1997,272:12008-120013.
[14] LAUTH X,SHRIKE H,BURNS J C,et al. Discovery and characterization of two isoforms of moronecidin,a novel antimicrobial peptide from hybrid striped bass [J]. J Biol Chem,2002,277(7):5030-5039.
[15] SCHNAPP D,KEMP G D,SMITH V J. Purification and characterization of a proline-rich anti-bacterial peptide,with sequence similarity to bactenecin 7,from the haemocytes of the shore crab,Carcinus maenas[J]. Eur J Biochem,1996,240:532-539.
[16] RELF J M,CHISHOLM J R,KEMP G D,et al. Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5 kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab,Carcinus maenas [J]. Eur J Biochem,1999,264:350-357.
[17] HUANG W S,WANG K J. Purification and part characterization of a novel antibacterial protein Scygonadin,isolated from the seminal plasma of mud crab Scylla serrata [J]. J Exp Mar Biol Ecol,2006,339:37-42.
[18] WANG K,HUANG W S.A male-specific expression gene encodes a novel anionic antimicrobial peptide,scygonadin,in Scylla serrata [J].Mole cular Immunology,2007,44(8):1961-1968.
[19] BOMAN H G,NILSSONI,ASMUSON R B,et al.Inducible antibacterial defense system in Drosophila [J].Nature,1972,237:232-235.
[20] LEE J Y,BOMAN A,CHUANXINS,et al.Antibacterial peptides from pig intestine:Isolation of a mammalian cecropin[J].Proc Natl Acad Sci USA,1989,86:9159-9162.
[21] 陆莹瑾,王禾,屈贤铭.抗菌肽的固相合成,分离纯化与构效关系的研究[J].生物工程学报,1997,13(1):35-41.
[22] 李文春,李松柏. 抗菌肽在畜牧业上的应用前景 [J]. 饲料工业 2005,16:14-16.
[23]朱颐申,王卫国,邱芊,等.抗菌肽的研究进展[J].生物加工过程,2004,2(3):5-9.
[24] REED W A,ELZER P H,ENRIGHT F M,et al. Interleukin 2 promoter pen-hancer controlled expression of a synthetic cecropin- (下转第 3282 页)

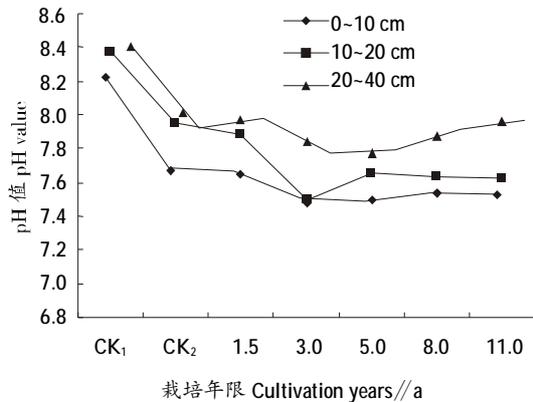


图3 不同栽培年限大棚土壤 pH 值变化

Fig. 3 Soil pH change of in greenhouse of different cultivation years 呈现下降的趋势(图3)。8.0、11.0年大棚土壤 pH 值又有所回升,这与农户采取客土改良等措施有关。

2.3 不同栽培年限大棚土壤阳离子交换量(CEC)变化 由图4可知,大棚土壤的CEC在0~20 cm土层随栽培年限的延长略有上升,在20~40 cm土层变化不明显。大棚土壤CEC变幅在11.466~14.059 cmol/kg、露天菜地土壤CEC平均14.066 cmol/kg,除11.0年大棚土壤CEC大于露天菜地和拱棚土壤外,1.5、3.0、5.0、8.0年大棚土壤均低于露天

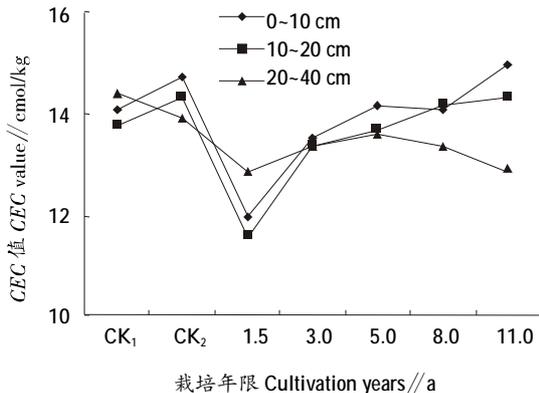


图4 不同栽培年限大棚土壤阳离子交换量

Fig. 4 Cation exchange capacity in greenhouse soil of different cultivation years

菜地及拱棚土壤。

3 结论与讨论

(1)随着栽培年限的延长,大棚土壤中水溶性总盐含量呈逐渐增高的趋势。对不同栽培年限的大棚土壤总盐含量进行方差分析可知, $F=16.997>F_{0.01}=5.06$,3.0年大棚0~40 cm土层土壤盐分含量与露天菜地、1.5、5.0、8.0、11.0年大棚土壤之间呈极显著差异,并且大棚土壤不同层次间盐分含量也表现出显著性差异;在作物生长周期内,受施肥等管理措

施的影响,总盐含量随生育期延长呈先下降而后又上升的变化趋势。

(2)大棚土壤 pH 值随栽培年限的延长逐渐下降,但随着土壤层次的加深 pH 值逐渐升高。土壤 pH 值的下降是由于氮肥在土壤中分解后生成硝酸盐留在土壤中,在缺乏淋洗条件下,这些硝酸盐积累导致土壤酸化所致;也有报道,大量施用以鸡粪等为主的有机肥,有机肥腐解以后产生大量的有机酸,也可以导致 pH 值下降^[5-7];另外,无机肥中的 SO_4^{2-} 等强酸性阴离子,部分被植物吸收,部分残留在土壤中,也成为 pH 值下降、发生盐渍化的主要原因之一。对影响 pH 值下降的主导因素还有待于进一步研究。在番茄不同生长期对 3.0 年大棚土壤 pH 值进行研究发现,大棚土壤由于受管理水平、施肥时期等因素的影响较大,土壤的 pH 值并没有发生规律性的变化。

(3)大棚土壤 EC 值总体上随栽培年限的延长而增高,但在番茄不同生育时期土壤 EC 值随番茄的生育时期的延长而呈下降趋势;土壤 EC 值与总盐含量具有一定的相关性,在 0~10 cm 表层,EC 值与总盐含量呈显著正相关, $R^2=0.9106$,在 20 cm 以下随土层的加深相关性逐渐减弱。大棚蔬菜生育周期内持续的追肥导致了土壤盐分和 EC 值的变化,而连年超强度的施肥则造成了大棚土壤盐渍化的加剧。

(4)许多研究者把 NO_3^- 含量作为发生土壤盐渍化的主要测定指标之一^[8-10]。该研究未测定土壤 NO_3^- 含量,大棚土壤中阴离子含量: $SO_4^{2-}>HCO_3^->Cl^-$,没有 CO_3^{2-} 存在,测定的阴离子以 SO_4^{2-} 为主,平均占总盐含量的 27.42%;土壤阳离子以 Ca^{2+} 为主,占总盐含量的 21.46%, Na^+ 不是主要的盐分离子。

参考文献

- [1] 吴志行.设施农业[M].南京:江苏科学技术出版社,2001.
- [2] 鲍士旦.土壤化学分析[M].3版.北京:中国农业出版社,2000:1-199.
- [3] 朱世东.蔬菜大棚土壤盐分累积及防治[J].上海蔬菜,1988(1):23.
- [4] 熊汉琴,王朝辉,罗贵斌.不同种植年限蔬菜大棚土壤次生盐渍化发生机理的研究[J].陕西林业科技,2006(3):22-26.
- [5] 刘艳军,姜勇,梁文举,等.蔬菜温室土壤某些化学性质的演变特征[J].应用生态学报,2005,16(11):2218-2220.
- [6] LIU J L, LIAO W H, GAO Z L, et al. The status and impact factors of accumulating in cover vegetable field in Hebei Province [J]. J Hebei Agric Univ, 2004, 27(1):19-24.
- [7] 吴凤芝,刘德,王东凯,等.大棚蔬菜连作年限对土壤主要理化性状的影响[J].中国蔬菜,1998,(4):5-8.
- [8] 内海修一[日].保护地园艺——环境与作物生理[M].北京:农业出版社,1984.
- [9] 侯云霞,钱光熹,王建明,等.上海蔬菜保护地的土壤盐分状况[J].上海农业学报,1987,3(4):31-38.
- [10] 冯永军,陈为峰,张蕾娜,等.设施园艺土壤的盐化与治理对策[J].农业工程学报,2001,17(2):111-114.