

抗菌肽的结构与功能研究

马珣玻¹, 张玉明², 倪志华^{2,3}, 周艳芬^{2,3}

(1. 河北大学基础医学院, 河北保定 071000; 2. 河北大学生命科学学院, 河北保定 071002; 3. 河北省生物工程技术研究中心, 河北保定 071002)

摘要 抗菌肽是一种具有抗菌、抗病毒的天然活性物质。在基础理论研究领域, 抗菌肽是研究生物大分子结构的重要材料。同时, 其独特的生物抗菌活性又在医药工业具有广阔的应用前景。抗菌肽的结构组成与其生物活性密切相关。以 3 类典型抗菌肽为例, 阐述多肽结构对于生理功能的重要性, 以展示抗菌肽重要的理论及应用价值。

关键词 抗菌肽; 防卫肽; 杀菌肽; 羊毛硫抗生素

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 0517 - 6611 (2009) 23 - 10878 - 03

Research on the Structure and Functions of Antimicrobial Peptides

MA Xiang-bo et al (School of Basic Medical Science, Hebei University, Baoding, Hebei 071000)

Abstract Antimicrobial peptides are natural bioactive substances with anti-bacterial, anti-viral activity. In the field of fundamental research, antimicrobial peptides are important materials to study the structure of biological macromolecules. At the same time, their unique biological activity will be widely applied in the pharmaceutical industry. Structure of antimicrobial peptides is closely related to their bioactivity. Taking three typical antimicrobial peptides as examples, the important relation between the structure of peptide and their physiological function was discussed, in order to demonstrate the importance theory and application value of antimicrobial peptides.

Key words Antimicrobial peptides; Defensin; Cecropins; Lantibiotics

抗菌肽 (Antimicrobial Peptides) 是生物体产生的一种具有强抗菌作用的阳离子多肽, 是生物先天免疫系统的重要组成部分^[1]。抗菌肽在自然界分布广泛, 在微生物、动植物体内都有发现。抗菌肽大多具有广谱抗菌活性, 并且对真菌、病毒及癌细胞也有杀伤作用, 在杀虫、除草等方面也有独特活性。抗菌肽生化性质稳定、水溶性好、抗菌机理独特, 对高等动物正常细胞无毒害, 具有广泛的应用前景。

抗菌肽的作用机理与其自身结构具有密切关系。一般认为抗菌肽主要是作用于细菌的细胞膜, 通过破坏细胞完整性来发挥抗菌效应。研究发现, 构成抗菌肽分子的氨基酸残基中大多为带正电荷的氨基酸。首先, 抗菌肽通过其正电荷与细菌细胞膜磷脂分子上的负电荷形成静电吸附而紧密结合到质膜上; 然后, 抗菌肽分子的疏水端借助分子中连接结构的柔性插入到细菌细胞膜中, 并牵引整个分子进入质膜, 扰乱了质膜上蛋白质和脂质原有的排列秩序; 最后, 多个抗菌肽分子间通过相互位移而聚合形成跨膜离子通道。这样, 抗菌肽通过一系列作用在细菌质膜上形成跨膜离子通道。细胞膜出现通道, 会导致胞内离子大量流失, 细菌不能保持其正常渗透压而死亡。随着对抗菌肽结构与功能、抗菌肽 - 生物膜相互作用机理、抗菌肽基因的分子生物学、抗菌肽基因工程研究的深入进行, 抗菌肽在医疗、农业等领域显现出广阔的应用前景。目前抗菌肽已经成为研究蛋白质结构与功能的理想材料, 已经在食品防腐、临床治疗、动植物抗病等多个领域应用。

1 抗菌肽的分类及其杀菌机理

迄今为止, 已有 70 多种抗菌多肽的结构被测定, 抗菌肽的概念得到了极大的扩展。根据抗菌肽的结构, 可将其分为 5 类^[2]: ①单链无半胱氨酸残基的 α -螺旋, 或由无规卷曲连接的两段 α -螺旋组成的肽; ②富含某些氨基酸残基但不含半

胱氨酸残基的抗菌肽; ③含 1 个二硫键的抗菌多肽; ④有 2 个或 2 个以上二硫键、具有 β -折叠结构的抗菌肽; ⑤由其他已知功能的较大的多肽衍生而来的具有抗菌活性的肽。

1.1 具有两亲螺旋结构的线性多肽

1.1.1 杀菌肽 (Cecropins)。1989 年, Lee 等从猪小肠中分离到了杀菌肽 P1, 后经证实杀菌肽是一类来源于动物的抗菌肽, 该类多肽抗生素一般含有 37 ~ 39 个氨基酸残基, 不含半胱氨酸。杀菌肽分子的 N 端区域具有强碱性, 可形成近乎完美的双亲螺旋结构, 而在 C 端区域可形成疏水螺旋, 两者之间有甘氨酸和脯氨酸形成的铰链区, 多数多肽的 C 端被酰胺化, 酰胺化对其抗菌活性具有重要作用。用圆二色谱和二维核磁共振谱法对杀菌肽 P1 的溶液构象分析表明, 在水溶液中, 杀菌肽 P1 的构象呈自由卷曲; 而其在与细胞膜疏水环境相似的六氟异丙醇溶液中, 则形成 α -螺旋^[3]。这说明它在水溶液中没有稳定的构象, 只是在结合上或接近细胞膜环境时才形成其发挥功能的高级结构, 这可能也是杀菌肽 P1 具有很高的热稳定性的原因。研究表明, 两亲 α -螺旋是其抗菌活性必需结构。改变 α -螺旋的螺旋度会影响抗菌肽活性。如果用螺旋倾向高的氨基酸代替螺旋倾向低的残基, 抗菌活性将明显提高, 反之则下降^[4]。

1.1.2 爪蟾抗菌肽 (Magainins)。爪蟾抗菌肽最初是从蟾蜍的皮肤中分离得到的^[2], 后来在哺乳动物的神经组织和肠组织中发现了其类似物。对蛙类抗菌肽的研究发现, 这类抗菌多肽都有形成两亲 α -螺旋的倾向。只要是有利于形成两亲 α -螺旋结构的抗菌肽氨基酸残基的替换, 一般都会提高抗菌肽的抗菌活性。且它们大多都是碱性多肽, 容易与酸性的生物膜的层状排列的脂类双分子层相结合, 依靠两亲的 α -螺旋结构形成跨膜的离子通道, 介导一系列的生物效应。

具有两亲螺旋结构的抗菌肽的杀菌机理是依赖 α -螺旋结构, 作用于细菌细胞膜的脂类双分子层, 使细菌细胞膜破裂, 并最终导致细菌细胞壁的溶解。Tomas 的研究认为, 在结构上相似的杀菌肽类物质能在细胞膜上形成了电势依赖通道^[5]。通道的形成过程为: 首先, 在质膜与水相界面上, 抗菌

基金项目 河北省保定市科技局项目 (08ZF097)。

作者简介 马珣玻 (1974 -), 男, 河北保定人, 硕士, 讲师, 从事病原微生物学研究。

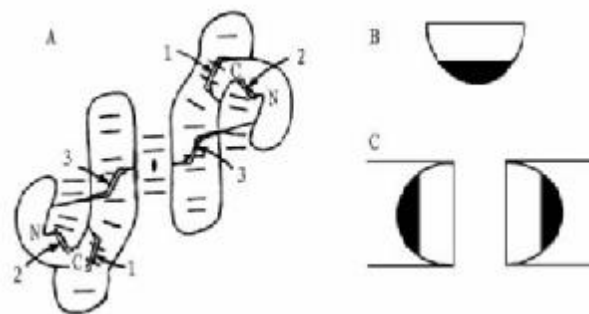
收稿日期 2009-04-20

肽与脂质双层间通过静电相吸而靠近;然后,借助于分子中 N 端与 C 端间的连接结构的柔性,抗菌肽分子中的疏水端插入质膜中,而刚性分子则不能完成这一步;最后两性性 α -螺旋也插入质膜中,破坏了脂质双层原有的有序结构,使细胞不能保持正常渗透压而死亡。

1.2 含有二硫键的多肽 这类多肽的典型代表是防卫肽 (Defensins), 防卫肽在植物与动物中普遍存在。防卫肽对多种细菌和某些真菌具有杀伤作用,其抗真菌活性目前受到普遍关注。最初发现的 α -防卫肽来源于哺乳动物的组织中,一般含有 29~34 个氨基酸残基,其中 6 个保守的半胱氨酸形成 3 个分子内二硫键。此外,其第 6 位和第 15 位的精氨酸、第 24 位的甘氨酸也是保守的。 α -防卫肽可形成 3 层的 β 片层结构,通过 3 个二硫键和 Arg6 与 Glu24 之间的盐桥而被稳定。实际上,这几个保守氨基酸的存在,保证了 α -防卫肽空间结构的保守性,对其生物活性的稳定至关重要。

通过对来源于人的防卫肽 HNP-3 的结构分析表明^[6],其在晶体状态下以二聚体形式存在(见图 1)。不对称单元的 2 个分子紧密靠近并以二次旋转轴对称,每个二聚体都有 3 股反平行的 β -折叠片以二硫键连接,二硫键在其中主要起保持结构刚性的作用。在不对称单元中的 2 个分子相似,2 个单元体间以 4 个直接的氢键和 2 个通过定向水分子形成的氢键相连。每个单体中的 Cys、Tyr 和 Phe 残基间的疏水相互作用保证了二聚体结构的进一步稳定。整个结构形成一个非极性顶和极性底的“篮状(Basket-shaped)”结构,表明防卫肽 HNP-3 正是通过这种具有两性性的二聚体结构使其可以结合并渗透细菌细胞膜的双磷脂层。HNP-3 的结构可能对所有防卫肽都适用^[7]。

杀菌肽具两亲 β -折叠构型,杀菌活性在于渗透细菌的细胞膜。其作用机理类似于杀菌肽在质膜上形成离子通道。由于 β -折叠的两亲性,防卫肽二聚体与脂质双层相互作用过程中,可能通过单个二聚体楔入脂层,也可能通过多个二聚体分子自身相互作用而贯穿脂质双层,从而形成通道,造成细胞内容物渗漏而破坏细胞^[8]。



注: A, HNP-3 二聚体的结构; B, 防卫肽单体示意(深色表示疏水区,浅色表示亲水区); C, HNP-3 二聚体在细胞膜上的形态。
Note: A, The structure of HNP-3 dimer; B, HNP-3 monomer (Dark-colored part indicates hydrophobic area; Light-colored part indicates hydrophilic area); C, HNP-3 dimer in cell membrane.

图 1 防卫肽 HNP-3 结构

Fig.1 Structure of defensin HNP-3

1.3 羊毛硫抗生素(Lantibiotics) 羊毛硫抗生素是指一些由细菌产生的,经翻译后加工而含有一些特殊有机基团的多肽抗生素。它们都含有自然界不常见的硫醚氨基酸残基即羊毛硫氨酸(Lanthionine)和甲基羊毛硫氨酸^[9]。

研究最广泛的羊毛硫抗生素是乳链菌肽(Nisin),它是来源于乳酸菌的一种多肽抗生素。乳链菌肽主要对革兰氏阳性菌起作用,对革兰氏阴性菌不起作用。已被广泛应用作食品保鲜剂^[10]。乳链菌肽由 34 个氨基酸组成,含有羊毛硫氨酸、甲基羊毛硫氨酸等特殊基团。核磁共振谱显示其结构没有一个明确且完全的折叠,但在水溶液中却有较好的柔韧性,这表明该分子显然是两性分子。乳链菌肽分子有 5 个硫醚键,形成 A、B、C、D、E 共 5 个环状结构,乳链菌肽的分子结构如图 2 所示。对于 Nisin 的单体,其中含有 5 种稀有氨基酸: Abu(氨基丁酸)、Dha(脱氢丙氨酸)、Dhb(β -甲基脱氢丙氨酸)、Ala-S-Ala(羊毛硫氨酸)、Ala-S-Abu(β -甲基羊毛硫氨酸),它们通过硫醚键形成 5 个环。氨基末端为异亮氨酸,羧基末端为赖氨酸。其分子式为: $C_{143}H_{228}N_{42}O_{37}S_7$ 。B、D、E 环是通过硫醚键固定的 β -折叠, C 和 D 环之间有一个柔韧的绞

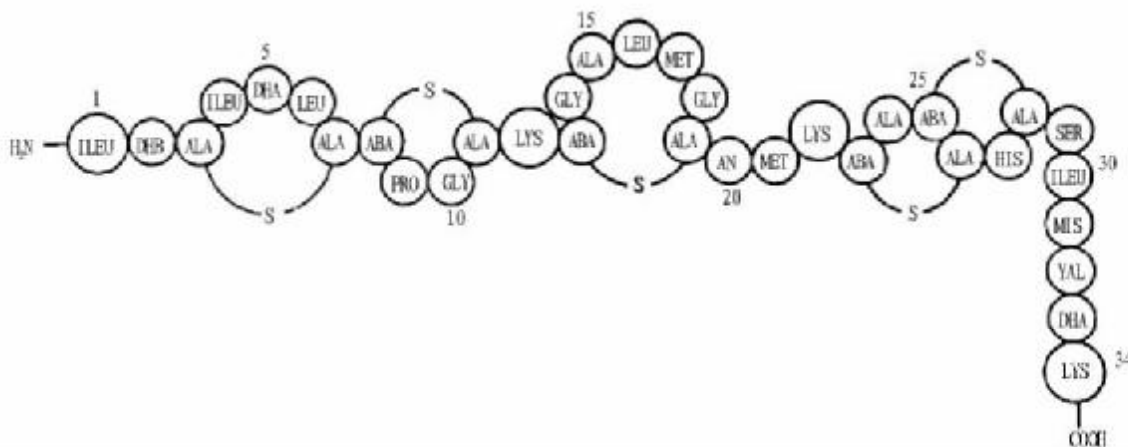


图 2 乳链菌肽的结构

Fig.2 Structure of nisin

链区,对该分子插入细胞膜起重要作用^[11]。

目前研究认为乳链菌肽作用的原始靶向也是细胞膜,它是通过溶解革兰氏阳性菌的肽聚糖层到达细胞膜的。乳链

菌肽与细菌细胞膜相互作用的分子机制分为 3 步^[12]: ①肽与细胞膜结合; ②肽插入细胞膜; ③细胞膜渗漏。关于乳链菌肽对细胞膜的作用有几种假设模型,大部分是建立在“桶-

穿孔”模型基础上的,这最早是由 Sahl 等提出的。假设乳链菌肽的 C-末端与带负电荷的磷脂发生极性作用。乳链菌肽的疏水残基与脂类的脂酰链相互作用,极性残基位于膜-水的界面上。接着肽转化为一种跨膜定向,形成一个簇,中心形成一个充满水的孔。如果这一过程中发生肽聚集,那么结合上的带负电荷的脂将和肽一起插入膜,形成一个脂簇,产生楔形孔。最终由于细胞内容物的外漏,导致细菌死亡^[8]。

2 抗菌肽的研究及应用

2.1 抗菌肽在医药工业中的应用

目前,所有的常规抗生素都出现了相应的抗药性致病株系,致病菌的抗药性问题已经日益严重地威胁着人们的健康。传统抗生素的作用机理是阻断大分子的合成,而抗菌肽是作用于细胞膜或直接作用于致病菌的 DNA,所以病菌不易产生耐药性,并且病毒和真菌也受抗菌肽的攻击,由此显示了抗菌肽所具有的独特研究和应用价值^[13-14]。

癌症是人类疾病中的一大难题,目前使用的化疗药物既杀死癌细胞又杀死正常的人体细胞,造成较大的副作用。而抗菌肽能特异地抑制某些肿瘤细胞的生长,且对人体正常细胞无害^[15]。初步认为抗菌肽对癌细胞的特异识别与以下几个因素有关^[16]:①由于肿瘤细胞的高代谢引起细胞膜电位的改变;②肿瘤细胞膜外表面含有更高的酸性磷脂;③肿瘤细胞的细胞骨架或胞外基质的变化。目前已经发现杀菌肽类物质、爪蟾抗菌肽类物质都对肿瘤细胞具有选择性杀伤作用。Quinones-Mateu 等的研究发现人类 β -防御素-2、HBD-3 在 PBMCs 中可以通过直接结合病毒颗粒或下调 HIV-1 的核心受体 CXCR4 的表达阻止 HIV 的复制^[17]。在 ground beads 中发现的一种分子量 7 kD 左右的抗菌肽,其 N 端序列与防御素高度同源,它可以抑制 HIV-1 反转录酶的活性,从而影响 HIV 的感染^[18]。这表明抗菌肽对艾滋病也有抑制作用。对抗菌肽的抗病毒潜能的研究将对艾滋病药物的开发具有深远意义。

2.2 抗菌肽的结构特征及其在结构生物学的应用

随着多肽分离技术和结构鉴定技术的突飞猛进,尤其是反相 HPLC、二维 NMR、FAB 质谱和手性色谱的应用,使结构被鉴定的肽数目激增。抗菌肽的发现激发了人们对构效关系研究的兴趣。科学家开始合成了一些类似物,并通过一些氨基酸替代试验来研究结构与活性之间的联系,通过试验发现了影响活性的结构因素^[8]。

2.3 抗菌肽的基因工程研究与应用

抗菌肽在动物体内含量极微。从动物体内提取抗菌肽产量低、费时长、工艺复杂、费用昂贵,无法实现大规模生产,这成为制约抗菌肽进入实际应用的最大障碍。因此,开展抗菌肽基因工程研究具有重要意义。近年来人们相继发现一些生物体中的某些天然活性肽具有杀虫、除草或杀菌的活性,而且有些天然活性肽还可以作为遗传工程中的植物保护剂或作为农药开发的先导化合物,因此一些多肽抗生素已经被用于植物抗病基因工程^[19]。多肽抗生素动物转基因的研究也已经取得了一些进展,比如可以通过基因工程的方法将动物抗菌肽基因和人淋巴因子基因融合表达来治疗某些疾病^[20]等。

近年来,以酵母为基因工程受体菌的研究引起人们的重

视,酵母具有比大肠杆菌更完备的基因表达调控机制和对表达产物的加工修饰及分泌能力,并且不会产生内毒素,是基因工程中良好的真核基因受体菌。自 1978 年 Hinnen 等首先试验酵母转化成功后,已有人干扰素基因、乙型肝炎表面抗原基因、 α -淀粉酶基因等数 10 种外源基因在酵母中获得表达。国内研究者大量研究表明,利用酵母表达抗菌肽是一条可行的道路,如能在表达产率上得到进一步提高,将为抗菌肽早日进入临床应用奠定良好的基础。

3 结论

综上所述,抗菌肽结构简单但又具有很强的生物活性,在基础理论研究领域是研究蛋白质结构与功能不可多得的好材料。研究抗菌肽可以了解氨基酸顺序和空间结构与生物活性、作用特异位点之间的联系,为进一步研究复杂结构的蛋白质提供基础。而且在应用方面,抗菌肽也会显示其巨大的潜力,为食品、医药产业的发展提供原动力。今后,对抗菌肽的研究应着重阐明其在体内表达的诱导机制及结构域与活性的关系,从而为其迅速应用提供理论基础。

参考文献

- [1] BROGDEN KIM A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3: 238 - 250.
- [2] BRAHMACHARY M, KRISHNAN S P, KOH J L, et al. A database of antimicrobial sequences [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32 (1): 586 - 589.
- [3] BIRCHLER T, SEIBL R, BUCHNER K, et al. Human Toll-like receptor 2 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta defensin 2 in response to bacterial lipoprotein [J]. *Eur J Immunol*, 2001, 31: 3131 - 3137.
- [4] HANCOCK R E, SCOTT M G. The role of antimicrobial peptides in animal defences [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97: 8856 - 8861.
- [5] TOMAS GANZ. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2003, 3: 710 - 720.
- [6] MICHAEL ZASLOFF. Antimicrobial peptides of multicellular organisms [J]. *Nature*, 2002, 415: 389 - 395.
- [7] SABERWAL G, NAGARAJ R. Cell-lytic and action of the antibacterial peptides that act by perturbing the barrier function of membranes [J]. *Bioche Biophys Acta*, 1994, 1197: 109 - 131.
- [8] 刘琳, 马廷方, 祝永强, 等. 抗菌肽的结构特征及其与活性的关系 [J]. *药物生物技术*, 2008, 15 (1): 64 - 67.
- [9] 钟瑾, 刘刚, 还连栋. 羊毛硫细菌素生物合成基因簇的遗传分析 [J]. *中国抗生素杂志*, 2006, 31 (9): 513 - 517.
- [10] 王步江, 杨公明. 乳链菌肽——天然防腐保鲜剂在食品中的应用 [J]. *保鲜与加工*, 2005 (4): 1 - 2.
- [11] KRAAIJ C. Lantibiotics: biosynthesis, mode of action and application [J]. *Nat Prod Rep*, 1999, 16: 575 - 581.
- [12] 顾觉奋, 何文杰. Lantibiotic: 一类新颖的抗菌肽研究进展 [J]. *国外医药抗生素分册*, 2001, 22 (6): 274 - 278.
- [13] 彭智. 抗菌肽及其临床应用前景 [J]. *微生物学免疫学进展*, 2006, 34 (1): 74 - 77.
- [14] 安春菊, 盛长忠, 李德森, 等. 一类潜在的新药——抗菌肽 [J]. *中国新药杂志*, 2003, 12 (9): 704 - 707.
- [15] 李珀, 于娟, 赵瑞君. 昆虫抗菌肽对人淋巴瘤细胞杀伤作用及筛选 [J]. *中国公共卫生*, 2009, 25 (1): 98 - 99.
- [16] 孙超, 王晖, 孙波, 等. 多肽抗生素研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2000, 18 (6): 605 - 609.
- [17] QUINONES-MATEU M E, LEDERMAN M M, FENG Z, et al. Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication [J]. *AID*, 2003 (17): 39 - 48.
- [18] WONG J N. Apotent defensin-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase [J]. *Peptides*, 2005, 26 (7): 1120 - 1125.
- [19] SHARMA A, SHARMA R. Transgenic expression of cecropin B, an antibacterial peptide from *Bombyx mori*, confers enhanced resistance to bacterial leaf blight in rice [J]. *Federation of European Biochemical Societies*, 2000, 484: 7 - 11.
- [20] 刘海峰, 王小花, 刘平, 等. 抗菌肽 CM4 与人可溶性 B 淋巴细胞因子 hBAFF 在大肠杆菌中的融合表达 [J]. *中国生物工程杂志*, 2008, 28 (3): 32 - 37.