

昆虫抗菌肽及其研究进展

卢晓风, 杨星勇, 程惊秋¹, 裴炎*

(西南农业大学生物技术中心, 重庆 400716; ¹ 华西医科大学附一院移植免疫实验室, 成都 610041)

昆虫是世界上最大的生物种群, 据估计其种类多于 10^6 , 个体数量超过 10^{18} , 占整个动物数量的 90%。除海洋外, 其余所有的生态环境都有昆虫的分布^[1], 这表明昆虫有极强的适应能力和防御能力。但研究发现, 昆虫并不具有高等动物那样高度专一的免疫体系, 即昆虫缺乏 B 和 T 淋巴细胞系统, 也无免疫球蛋白及补体的存在。而昆虫能在自然界占据极大的优势, 表明其先天性或获得性免疫能力是非常惊人的, 其防御系统也必然有独到之处。

大量研究表明, 在感染病菌或可能导致病菌感染(注射细菌或真菌, 体壁损伤等)的情况下, 昆虫能快速合成大量抗菌肽, 迅速杀灭已侵入的病菌, 并阻止病菌的继续侵染^[2]。到目前为止, 在昆虫中已发现了大量的抗细菌肽, 抗真菌肽, 以及既抗真菌又抗细菌的抗菌肽。这些抗菌肽不仅对细菌、真菌有广谱抗菌能力, 对病毒、原虫及癌细胞也有作用。此外, 还有作用机制独特, 对高等动物正常细胞无害等特点, 在面临抗药性和筛选新的抗生素极端困难的情况下, 昆虫抗菌肽可能成为抗生素的新来源。本文对昆虫抗菌肽的种类、特性、结构与活性的关系、分子设计、作用机理及其在医药中的应用前景和存在问题进行综述。

昆虫抗细菌肽

根据氨基酸组成和结构特征, 已研究的抗细菌肽分为 4 类, 即形成两性分子 α -螺旋的抗细菌肽类、有分子内二硫桥的抗细菌肽类、富含脯氨酸的抗细菌肽类及富含甘氨酸的抗细菌多肽类^[3]。

1 形成两性分子 α -螺旋的抗细菌肽类

这类抗细菌肽分子内有两性分子的 α -螺旋结构, 但不含半胱氨酸, 不具二硫桥。

Cecropins: 天蚕素类, 由 31 ~ 39 个氨基酸残基组成。N 端和 C 端都有 α -螺旋结构。N 端通常呈碱性, 带正电荷, 亲水; C 端酰胺化, 中性或微酸性, 不带电或带少量负电荷, 疏水。目前已从鳞翅目和双翅目昆虫中分离出 20 多种 cecropin 类似物^[3]。Cecropins 的抗菌谱包括革兰阴性和革兰阳性菌, 通过在细菌细胞膜上形成电势依赖通道 (voltage-dependent channel), 改变细胞膜的通透性, 使细胞内容物泄漏而杀菌。

Andropin: 仅存在于果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 雄成虫的生殖道中, 由 21 个氨基酸残基组成, 只作用于革兰阴性菌, 对革兰阳性菌无效。果蝇成虫的性交可以强烈诱导该抗菌肽基因的转录^[4]。

2 有分子内二硫桥的抗细菌肽类

与 cecropins 相似, 这类抗细菌肽在分子中也形成两性分子的 α -螺旋结构, 但在这肽分子中含有半胱氨酸, 并形成分子内二硫桥。

Insect defensins: 昆虫防御素, 首先从肉蝇 (*Phormia terranova*) 中分离得到, 因与哺乳动物防御素 defensins 高度同源而被命名为 insect defensins。后来从麻蝇 (*Sarcophaga peregrina*) 中也分离到这类抗菌肽, 命名为 sapecins^[5]。而从埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) 和冈比亚按蚊 (*Anopheles gambiae*) 中分离到昆虫防御素家族成员, 分别被称为 aedes defensins^[6] 和 preprodefensin^[7]。除双翅目昆虫外, 在半翅目、鞘翅目、膜翅目、毛翅目和蜻蜓目昆虫中都发现了昆虫防御素。

3 富含脯氨酸的抗细菌肽类

Apidaecins 和 abaecin: 蜜蜂 (*Apis mellifera*) 血淋巴中存在 4 种富含脯氨酸的抗细菌肽类。其中 3 种均由 18 个氨基酸残基组成, 称为 apidaecins^[8]。而另一种抗菌肽, abaecin, 含有 34 个氨基酸残基, 与 apidaecins 没有明显的同源性^[9]。但这些分子均富含脯氨酸, 且都只对革兰阴性菌有作用。

Drosocin 和 pyrrocoricin: 两种抗菌肽分别来源于果蝇^[10] 和无翅红蜻 (*Pyrrocoris apterus*)^[11]。

收稿日期: 1998-03-11

* 联系人 Tel: (023) 68251883, Fax: (023) 68864993

E-mail: peiyuan@s.wau.edu.cn

drosocin 由 19 个氨基酸残基组成, pyrrocoricin 包含 22 个氨基酸残基。两类抗菌肽分子中脯氨酸的含量均达到 30%, 而且都在第 11 个氨基酸残基(苏氨酸)上发生糖化作用。drosocin 的苏氨酸残基上连有 N-乙酰半乳糖胺-半乳糖结构, pyrrocoricin 则在相应的位置连有 N-乙酰半乳糖胺。用水解酶去除分子中的糖, 抗菌肽活性也继而消失, 这表明分子中的糖对维持抗菌肽的活性是必需的。drosocin 和 pyrrocoricin 在相对较低的浓度($0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)时, 就表现出抗菌作用, 但只对革兰阴性菌有效。

Metalnikowins: 从碧蜂(*P. parasina*)中分离出 4 种抗菌肽, 分别命名为 metalnikowin I, IIA, IIB 和 III^[12]。前两种由 15 个氨基酸残基组成, 后两种由 16 个氨基酸残基组成。四种抗菌肽高度同源, 仅在末端 3 个氨基酸残基上发生变化。分子内均富含脯氨酸, 含量近 30%。metalnikowins 与 drosocin 和 pyrrocoricin 有较高的同源性。不同的是, metalnikowins 分子中无苏氨酸残基, 没有糖链结构。而且, metalnikowins 表现出抑菌作用, drosocin 和 pyrrocoricin 则表现出杀菌作用。

4 富含甘氨酸的抗菌多肽类

Attacins: 分子量超过 20 Ku。从天蚕中分离出 6 种 attacin, 其中 4 种呈碱性, 2 种呈中性或微酸性。碱性和酸性 attacin 同源性高达 80%。attacins 仅对部分革兰阴性菌表现抑菌作用^[13]。

Sarcotoxins II: 分子量为 30 Ku, 是目前昆虫中发现的分子量最大的抗菌多肽, 来源于麻蝇^[14]。sarcotoxin II 分子 C-端大约 250 个氨基酸区域内富含甘氨酸, N-端约 15 个氨基酸区域内富含脯氨酸。与 attacin 一样, sarcotoxins II 也只对少数革兰阴性菌有作用。

Diptericins: 双翅肽, 存在于双翅目昆虫中, 分子量为 9 Ku。与 sarcotoxins II 相似, diptericins 分子的 C-端富含甘氨酸, N-端富含脯氨酸, 而且仅对少数革兰阴性菌有作用。从肉蝇中分离出的双翅肽, 在 10 和 54 位苏氨酸残基上均发生糖化作用, 而且连有相同的糖链, 即乙酰半乳糖胺—半乳糖—葡萄糖结构。糖链对维持抗菌肽的活性也是必需的, 这与富含脯氨酸的抗菌肽 drosocin 和 pyrrocoricin 相似^[15]。

昆虫抗真菌肽

AFP Iijima 等^[16]从麻蝇中分离出一种抗真菌

肽 AFP(anti-fungal peptide), 首次报道了昆虫抗真菌肽。AFP 由 67 个氨基酸残基组成, 分子中富含甘氨酸和组氨酸。其在蒸馏水和盐溶液中有较强的杀菌能力, 而在萨堡培养基上, 必须有呋喃西林(nitrofurazone)的存在才有抗菌活性。有趣的是, 从同一蝇中分离出的抗菌肽 sarcotoxin I A 对 AFP 抗真菌有增效作用。

Holotricin 3 从鞘翅目昆虫东北大黑鳃金龟(*Holotrichia diomphalia*)幼虫中分离得到, 由 84 个氨基酸残基组成。与麻蝇抗真菌肽 AFP 相似, holotricin 3 分子内也富含甘氨酸和组氨酸, 而且分子量相近, 但两者在氨基酸序列上却没有明显的同源性^[17]。

Drosomycin 果蝇幼虫和成虫经细菌诱导, 均可产生广谱抗真菌肽 drosomycin^[18]。该抗真菌肽由 44 个氨基酸残基组成, 分子内含 8 个半胱氨酸残基, 形成 4 个二硫桥。其与植物(*Raphanus sativus*)种子中的富含半胱氨酸的抗真菌肽 Rs-AFP₂ 高度同源。

既抗真菌又抗菌的昆虫抗菌肽

Metchnikowin 来自于果蝇, 由 26 个氨基酸残基组成, 对革兰阳性菌和真菌均表现抗菌作用。氨基酸序列和 cDNA 克隆的分析表明, 该抗菌肽在果蝇中以两种类似物存在, 两者高度同源, 只有 1 个氨基酸不同^[19]。

Thanatin 死亡素, 是刺肩蜂(*Podisus maculiventris*)成虫经诱导产生的一种抗菌肽。由 21 个氨基酸残基组成, 与青蛙皮肤中的抗菌肽 brevinins 有较高的同源性。该抗菌肽对革兰阳性、革兰阴性菌以及真菌都有很强的抗菌活性, 因此被称为死亡素 thanatin^[20]。

昆虫抗菌肽结构与活性的关系及分子设计

蛋白质的结构和功能密切相关。许多来自于不同物种的抗菌肽, 其一级结构有不少相似之处。如肽的 N-端半分子富含亲水的氨基酸残基, 特别是碱性氨基酸赖氨酸和精氨酸。C-端则含较多的疏水氨基酸残基。而且, 在抗菌肽的许多特定位置有一些较保守的氨基酸残基, 如 2 位的色氨酸, 5 位, 8 位及 9 位的赖氨酸, 11 位的天冬氨酸等。有些位置尽管残基不同, 但仍是保守性替换。来自同一目, 不同种

昆虫的抗菌肽,其一级结构更是极为相似,构成分子的氨基酸序列高度同源^[3]。提示不同抗菌肽在结构与活性的关系上可能有共同之处。但是,蛋白质功能主要取决于其高级结构。因此,要阐明结构与功能的关系,还需进一步研究其高级结构。目前,这方面的工作主要集中于分子中有两性分子 α 螺旋的肽类,即 cecropins 和 insect defensins。

Cecropin 的结构区域可分为 3 段,即 1 ~ 11 位, 12 ~ 24 位和 25-C 末端。其中,1 ~ 11 位形成两性分子 α 螺旋,12 ~ 24 位构成 β 转角或无规则卷曲,25-C 末端形成疏水螺旋^[21]。而 insect defensin 的三维结构包括 N 末端环(4 ~ 14 位),中部的两性分子 α 螺旋(15 ~ 23 位)及 C 末端的反向平行 β 折叠(27 ~ 31 位和 35 ~ 39 位),以及连接 β 折叠两条链的 U 型转角(32 ~ 34 位)^[22]。抗菌肽在缓冲液中呈自由卷曲。而模拟膜的疏水环境则能诱导抗菌肽的两性分子 α 螺旋的形成。表明 α 螺旋与抗菌肽的活性密切相关^[23]。进一步研究发现,改变两性分子 α 螺旋的螺旋度会影响抗菌肽的活性。譬如用螺旋倾向高的氨基酸残基代替螺旋倾向低的残基,抗菌肽的活性将明显提高。相反,降低抗菌肽两性分子 α 螺旋的螺旋度,将导致抗菌肽活性的急剧下降^[24]。可见两性分子 α 螺旋在维持抗菌肽活性中起着重要作用。

结构与活性的关系为抗菌肽的分子设计提供了理论依据。目前,抗菌肽分子设计的主要策略是:改变抗菌肽两性分子 α 螺旋的氨基酸组成,增强其螺旋度,即可能获得活性更高,抗菌谱更广的抗菌肽。Bomman 设计了 cecropin 的 4 种类似物,获得了与天然抗菌肽相似的合成肽^[25]。Jaynes 等以天然抗菌肽中活力最强的 cecropin B 为蓝本,置换了其中的许多氨基酸,只是保持了这些位置原有的极性,结果新抗菌肽分子的抗菌活性增强了,而且作用范围得以拓宽,可以杀死原虫^[26]。Bomman 抽取 cecropin A 和有抗菌活性的蜂毒素 melittin 分子中的片段,形成的杂合肽 CA(1 - 13)M(1 - 13)不仅有更高的抗菌活性,还克服了蜂毒导致溶血的缺点^[21]。抗菌肽分子的改造与设计已经成为获得新抗菌肽的重要途径。

昆虫抗菌肽的作用机理

目前,比较清楚的是昆虫抗菌肽的作用机制,包括细胞膜电势依赖通道的形成,抑制细胞呼吸,抑制细胞外膜蛋白的合成以及抑制细胞壁的形成。而对抗菌肽与真菌的作用机理还不清楚。

1 细胞膜电势依赖通道的形成

Okada 等^[27]发现抗菌肽扮演着离子泵的角色,它使细胞内的 K^+ 快速被析出,ATP 含量迅速下降,继而导致细胞死亡。Christensen 等^[28]通过脂质体膜经抗菌肽处理后的电势和电流的变化,判断出抗菌肽在膜上形成了孔道。Cociancich 等^[29]进一步发现,孔道的形成、开启和关闭都依赖于膜的电势。只有当膜的电势高于 110 mV 时,孔道才能形成或处于开启状态。因此,这种孔道又被称为电势依赖通道(voltage-dependent channel)。最近,Lockey 等^[30]通过电镜直接观察到抗菌肽细胞膜上造成的孔道,为电势依赖通道的形成提供了直接证据。

关于离子通道形成的具体过程,研究者们提出了几种模式。Christensen 等^[28]认为,离子通道的形成可分为 3 个步骤。即(1):抗菌肽分子通过静电作用被吸附到膜表面;(2):抗菌肽分子的疏水尾巴插入细胞膜;(3):抗菌肽分子的两性分子 α 螺旋插入膜内,多个抗菌肽分子共同作用形成离子通道。而 Fink 等^[31]认为,当抗菌肽作用于细胞膜时,N 端的两亲螺旋结合在膜表面,只有 C 端的疏水螺旋插入膜中,进而形成离子通道。Clague 等^[32]则认为,抗菌肽通过作用于膜蛋白,引起蛋白质凝聚失活,细胞膜变性而形成离子通道。

2 其它作用机制

抑制细胞呼吸 thanatin 在 $0.3 \sim 0.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,就对大肠杆菌表现出强烈的杀菌作用。但当其浓度提高到 $70 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,仍然检测不到细胞内 K^+ 的泄漏,这表明 thanatin 不是通过改变细胞膜通透性来杀菌的。当利用 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 thanatin 处理细菌时,1 h 后,可监测到细胞的呼吸作用变弱,6 h 后呼吸作用完全停止。由此认为,thanatin 是通过抑制细胞的呼吸作用来杀菌的^[20]。

抑制细胞外膜蛋白的合成 Carlsson 等人^[13]研究发现,attacin 能够干扰大肠杆菌细胞外膜蛋白 Omp C, Omp F, Omp A 以及 Lam B 基因的转录,使这些蛋白质含量减少,从而导致细胞膜的通透性增加,细菌的生长受到抑制。

抑制细胞壁的形成 sarcotoxins II 能够抑制细菌细胞壁的形成,使细菌不能维持正常的细胞形态而生长受阻。但对已经形成的细胞壁无作用^[33]。

昆虫抗菌肽的研究展望及问题

昆虫抗菌肽的活性浓度较低,对许多致病菌,如

致病型大肠杆菌、伤寒杆菌、硝酸盐杆菌等有抗菌作用^[34]。而且部分抗菌肽对一些临床耐药致病菌也有良好的抗菌作用。人类真菌病害在目前仍是一个难以解决的问题。昆虫抗真菌肽的发现,无疑为该类型病害的治疗提供了新的思路。疟原虫、病毒也受昆虫抗菌肽的攻击^[26],这意味着昆虫抗菌肽在医药中有广阔的应用前景。更为引人关注的是,昆虫抗菌肽对癌细胞有杀伤作用。B4 转化细胞, K562 细胞和 U937 细胞^[35], 白血病细胞 K560 以及肺癌细胞 A549^[34]都受到抗菌肽的攻击。但是抗菌肽对人体细胞的攻击有选择性,其对人体正常的 B 淋巴细胞无任何不良影响。而这正是目前使用的肿瘤化疗药所不具备的特性。此外,实验表明,抗菌肽无致畸变作用,无蓄积毒性,还不容易产生抗药性^[36]。由此看来,在目前不少病原菌对已有抗生素逐渐产生耐药性,而新的抗生素发现又极为困难的情况下,昆虫抗菌肽极有可能成为抗菌素、抗病毒素以及抗肿瘤药的新来源。

但是,抗菌肽要成为药物,目前还需要解决一些问题。首先是来源问题。由于昆虫抗菌肽的天然资源有限,化学合成和基因工程便成为获取抗菌肽的主要手段。化学合成肽类,成本较高。而通过基因工程,在微生物中直接表达抗菌肽基因,可能造成宿主微生物自杀而不能获得表达产物。以融合蛋白的形式表达抗菌肽基因,虽然可以克服这一缺点,但仍有表达产物少的问题。尽管来自青蛙皮肤的抗菌肽 maganin 类作为基因工程药物已进入临床 II, III 期实验,但人们认为,只有每克价格低于 10 美元,抗菌肽才可能商品化。因此,如何提高抗菌肽的生产效率,降低成本,是应用抗菌肽必须解决的问题。其次,与传统抗生素相比,昆虫抗菌肽的抗菌活性还不够理想。改造已有抗菌肽和设计新抗菌肽分子是创造高活力抗菌肽的有效途径。这就需要进一步研究抗菌肽结构与活性的关系和作用机理,为抗菌肽分子的改造和设计提供足够的理论依据。此外,有关昆虫抗菌肽药理药效方面的研究还很少,目前仅限于个别报道。要推动抗菌肽在医药中的应用,这方面的研究必须加强。

关键词 昆虫;抗真菌肽;抗菌肽;抗生素

参 考 文 献

- Cociancich S, Bulet P, Hetru C, et al. *Parasitology Today*, 1994, **10**: 132
- Hoffmann JA. *Curr Opin Immunol*, 1995, **7**: 4
- Hoffann JA, Jane way CA, Natori J, et al. *Phylogenetic Perspectives in Immunity*. RG Landes Company, 1994. 43 ~ 65
- Samakovlis C, Kylsten P, Kimbrell DA, et al. *Eur Mol Biol Organiz J*, 1991, **10**: 163
- Matsuyama K, Natori S. *J Biol Chem*, 1988, **263**: 17117
- Lowenberger C, Bulet P, Charlet M, et al. *Insect Biochem Molec Biol*, 1995, **25**: 867
- Richman AM, Bulet P, Hetru C, et al. *Insect Mol Biol*, 1996, **5**: 203
- Casteels P, Ampe C, Jacobs F, et al. *Eur Mol Biol Organiz J*, 1989, **8**: 2387
- Casteels P, Ampe C, Riviere L, et al. *Eur J Biochem*, 1990, **187**: 381
- Bulet P, Dimarcq J, Hetru C, et al. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 14893
- Cociancich S, Dupont A, Hegy G, et al. *Biochem J*, 1994, **300**: 567
- Chernysh S, Cociancich S, Briand JP, et al. *J Insect Physiol*, 1996, **42**: 81
- Carlsson A, Engstrom P, Bennich H. *Infect and Immunity*, 1991, **59**: 3040
- Ando K, Okada M, Natori S. *Biochem*, 1987, **26**: 226
- Bulet P, Hegy G, Lambert J, et al. *Biochem*, 1995, **34**: 7394
- Iijima R, Kurata S, Natori S. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 12055
- Lee SY, Moon HJ, Kurata S, et al. *Biol Pharm Bull*, 1995, **13**: 61
- Fehlbaum P, Bulet P, Michaut L, et al. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 33159
- Levashina EA, Ohresser S, Bulet P, et al. *Eur J Biochem*, 1995, **233**: 694
- Fehlbaum P, Bulet P, Chernysh S, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 1221
- Boman HG, Faye I, Gudmundsson GH, et al. *Fed Eur Biochem Soc Letters*, 1989, **259**: 103
- Cornet B, Bonmatin JM, Hetru C, et al. *Structure*, 1995, **3**: 435
- Steiner H. *Fed Eur Biochem Soc Letters*, 1982, **137**: 283
- Saberwal G, Nagaraj R. *Biochem Biophys Acta*, 1994, **1197**: 109
- Boman HG, Faye I, Gudmundsson GH, et al. *Eur J Biochem*, 1991, **201**: 23
- Jaynes JM, Xanthopoulos KG. *Bio Essays*, 1987, **6**: 263
- Okada M, Natori S. *Biochem J*, 1985, **229**: 453
- Chrestensen B, Fink J, Merrifield RB, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **28**: 5072
- Cociancich S, Ghazi A, Hetru C, et al. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 19239
- Locker TD, Ourth DD. *Eur J Biochem*, 1996, **236**: 263
- Fink J, Boman A, Boman HG, et al. *Int J Peptide Protein Res*, 1989, **33**: 412
- Clague MJ, Cherry RJ. *Biochim Biophys Acta*, 1989, **980**: 93

- 33 Ando K, Natori S. *J Biochem*, 1988, **103**: 735
34 陆莹瑾, 王禾, 屈贤明. 生物工程学报, 1997, **13**: 35
35 贾红武, 张双全, 戴祝英. 动物学研究, 1997, **18**: 325

- 36 贾士荣, 屈贤明. 马铃薯抗菌肽基因工程. 北京: 中国农业科技出版社, 1996. 98

PROGRESSES IN INSECT ANTI MICROBIAL PEPTIDES

Lu Xiaofeng (Lu XF), Yang Xingyong (Yang XY), Cheng Jingqiu (Cheng JQ) and Pei Yan (Pei Y)

(*Center Biotechnology, South west Agricultural University. Chongqing, 400716*)

KEY WORDS insect ; antimycotic peptide ; antimicrobial peptide ; antibiotic