

## 猪乳铁蛋白肽的分子改良及改良肽的生物学活性研究

韩菲菲 安 沙 谢永刚 刘倚帆 汪以真\*

(浙江大学饲料科学研究所, 动物分子营养学教育部重点实验室, 浙江省动物饲料与营养重点实验室, 杭州 310029)

**摘 要:** 本研究采用化学合成的方法获得了猪源乳铁蛋白肽 LFP-20 及其改良肽, 旨在通过研究该抗菌肽一级结构与抗菌活性的关系, 获得抗菌活性更高的改良肽。微量肉汤稀释法测定的最小抑菌浓度(MIC)及溶血性分析结果表明, 猪乳铁蛋白肽 LFP-20 及其改良肽 LF2A、LF-1 和 LF-3 对大肠杆菌、猪霍乱沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌及表皮葡萄球菌均具有抗菌活性; LFP-20 对 5 种试验菌株的 MIC 为 64~128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 改良肽 LF-1 和 LF-3 的 MIC 降低了 2~4 倍; 改良肽 LF2A 对 5 种试验菌株的抗菌活性没有提高, 但溶血性降低; 改良肽 LF-1 的抗菌活性有所提高, 但在 4、32、64、128 和 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时的溶血性也显著提高( $P < 0.05$ )。WST-1 和 LDH 法检测 4 种抗菌肽对人外周血单核细胞(PBMC)增殖的影响及细胞毒性结果表明, LF2A、LF-1 和 LF-3 对 PBMC 增殖的影响具有剂量依赖性; 与 LFP-20 相比, 25~200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LF-1 显著提高了 PBMC 的增殖( $P < 0.05$ ), 但在 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度下却抑制了 PBMC 的增殖( $P < 0.05$ ); 200 和 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LF-1 使得 PBMC 的乳酸脱氢酶(LDH)释放百分率显著提高( $P < 0.05$ ), 在 25~50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度下却对 LDH 释放具有降低作用( $P < 0.05$ )。对细胞膜去极化作用研究结果表明, 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的改良肽 LF-3 对大肠杆菌细胞膜的去极化作用明显增强, 而抗菌活性较低的 LFP-20 和 LF2A 对细菌细胞膜的去极化作用低于 LF-3。由此可知, 改良肽 LF-3 的抗菌活性比猪乳铁蛋白肽 LFP-20 提高了 2~4 倍, 且溶血作用和细胞毒性均没有显著增强; LF-3 可通过对细胞膜的去极化作用破坏大肠杆菌细胞膜电势梯度平衡, 推测对细胞膜的破坏作用是其发挥抗菌作用的途径之一。

**关键词:** 猪; 乳铁蛋白肽; 抗菌活性; 溶血性; 细胞毒性

**中图分类号:** S816.7

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1006-267X(2011)02-0241-09

近年来, 抗生素作为饲料添加剂的乱用甚至滥用现象所引发的一系列严重问题日益为人们所重视, 寻找有效的抗生素替代品已成为动物营养学领域关注的焦点。抗菌肽因具有分子量小、热稳定性高、杀菌范围广、作用机制独特等特点, 成为抗生素替代品的重要候选物。乳铁蛋白肽(lactoferricin, Lfcin)是来源于乳铁蛋白 N 端的抗菌肽, 目前研究比较深入的是牛乳铁蛋白肽(Lfcin B)和人乳铁蛋白肽(Lfcin H)<sup>[1]</sup>。Lfcin B 氨基酸序列

中富含 Trp/Arg 的区域(RRWQWR)是其保持抗菌活性所必需的<sup>[2]</sup>。核磁共振研究显示溶液中 Lfcin B 形成反向平行的  $\beta$ -折叠结构, Cys 3 和 Cys 20 形成链内二硫键, 起到稳定  $\beta$ -折叠结构的作用<sup>[3]</sup>; 也有研究表明, 二硫键在抗菌过程中作用不大, 被破坏后 Lfcin B 的抗菌活性并不减弱<sup>[4]</sup>。Lfcin H 是由来源于人乳铁蛋白 N 端第 1~49 位氨基酸残基组成的单链连续多肽, 一级结构与 Lfcin B 类似, 也含有 1 个由二硫键形成的环状结

收稿日期: 2010-07-27

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2007AA100602)、高等学校全国优秀博士学位论文作者专项资金资助项目(2007B6)资助

作者简介: 韩菲菲(1980—), 女, 内蒙古赤峰人, 博士研究生, 主要从事动物营养与免疫研究。E-mail: hanfei27@yahoo.com.cn

\* 通讯作者: 汪以真, 教授, 博士生导师, E-mail: yzwang@zju.edu.cn

构<sup>[5]</sup>。Strøm 等<sup>[6]</sup>研究发现,将 Lfcin B 氨基酸序列中的个别氨基酸残基替换为 Trp 后,其对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌活性明显提高。目前对猪乳铁蛋白肽的研究相对较少。Strøm 等<sup>[7]</sup>报道化学合成的含 15 个氨基酸的猪乳铁蛋白肽 Lfcin P 15 片段不具有抗菌活性。Chen 等<sup>[8]</sup>通过对猪、牛、人等 8 个物种乳铁蛋白 N 端序列的对比分析,发现了猪乳铁蛋白 N 端与其他物种乳铁蛋白高度同源的序列,将其命名为 Lfcin P;化学合成的 Lfcin P 20 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的抑菌活性介于 Lfcin B 20 和 Lfcin H 20 之间。因此,本研究拟通过对猪乳铁蛋白肽 LFP-20 (Lfcin P 20) 的分子改良,研究氨基酸替换对其抗菌活性、红细胞溶血率以及真核细胞毒性的影响,以期在天然猪乳铁蛋白肽的基础上获得抗菌活性更强、对真核细胞毒性小的改良抗菌肽,为利用基因工程方法生产抗菌肽提供优良的抗菌肽模板,同时对 LFP-20 及其改良肽的杀菌机制进行初步探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

革兰氏阴性菌 *Escherichia coli* ATCC25922、*Salmonella choleraesuis* CMCC50020、*Salmonella ty-*

*phimurium* CMCC50013 和革兰氏阳性菌 *Staphylococcus aureus* ATCC25923 由本实验室保存,临床分离 *Staphylococcus epidermidis* C621 和用于细胞膜去极化分析的 *Escherichia coli* UB1005 由 Hancock 博士捐赠, -70 °C 暗处保存于 1.5% 甘油冷冻管中备用。RPMI 1640 培养基、胎牛血清(FBS) 购自 Gibco 公司, Ficoll-Paque™ PREMIUM 购自 GE Healthcare 公司, MH 肉汤培养基、琼脂粉购自 DIFCO 公司, WST-1 试剂、细胞毒性检测试剂盒 [乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒] 购自 Roche 公司, 荧光探针 DiSC<sub>3</sub>(5) 购自 Invitrogen 公司。新鲜的健康人血液由志愿者捐赠。

### 1.2 改良肽的设计及合成

根据已报道的猪乳铁蛋白肽 LFP-20 序列,将第 2 位和第 17 位的 Cys 替换为 Ala<sup>[9]</sup>, 研究 Cys 在 LFP-20 抗菌活性中发挥的作用;将第 9 位和第 18 位的 Ile 替换为 Trp, 以增加芳香族氨基酸 Trp 的含量<sup>[6]</sup>;同时进行第 2 位和第 17 位氨基酸和第 9 位和第 18 位氨基酸的替换,研究 Ala 和 Trp 对猪乳铁蛋白肽 LFP-20 发挥抗菌活性的影响。LFP-20 及其改良肽(表 1)由吉尔生化(上海)有限公司采用 F-moc 法固相合成,经高效液相色谱纯化,纯度为 95%,MALDI-TOF MS 检测分子量(表 1)。

表 1 抗菌肽的氨基酸序列

Table 1 Amino acid sequence of antimicrobial peptides

名称 Name	序列 Sequence	理论分子量 Theoretical MW	测定分子量 Observed MW
LFP-20	KCRQWQSKIRRTNPIFCIRR	2 590.10	2 590.05
LF2A	KARQWQSKIRRTNPIFAIRR	2 525.97	2 526.00
LF-1	KCRQWQSKWRRTNPIFCWRR	2 736.20	2 736.24
LF-3	KARQWQSKWRRTNPIFAWRR	2 672.10	2 672.12

### 1.3 最小抑菌浓度测定

猪乳铁蛋白肽 LFP-20 及其改良肽 LF2A、LF-1、LF-3 的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)采用微量肉汤稀释法<sup>[10]</sup>测定。将待测细菌划板于 MH 肉汤琼脂平板培养 12~18 h,挑取单菌落接种于 MH 肉汤培养基 37 °C 180 r/min 过夜培养。将培养至对数生长期的菌液稀释至  $2 \times 10^5 \sim 7 \times 10^5$  CFU/mL ( $OD_{600\text{nm}} = 0.5$ );用无菌蒸馏水将抗菌肽配制为最高待测浓度 20 倍的储备液,再进行系列对倍稀释,得到质量浓度为待测浓度 10 倍

的系列稀释抗菌肽溶液;向无菌的 96 孔聚丙烯培养板中的 1~11 孔分别加入 90 μL 稀释好的菌悬液,12 孔加 100 μL MH 肉汤培养基;1~10 孔逐一加入 10 μL 相应浓度的待测抗菌肽,第 11 孔加入 10 μL 无菌蒸馏水作为细菌阳性对照孔;将培养板置于 37 °C 培养箱中保湿培养 24 h 后观察结果。MIC 即为能阻止细菌生长的最小抗菌肽浓度。

### 1.4 溶血作用测定

人红细胞及外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)的分离按照 Ficoll-Paque

PREMIUM 试剂说明书操作。用肝素抗凝管抽取新鲜人血液,按照 1 : 1 的比例加入 37 °C 预热的 RPMI 1640 培养基稀释并混匀后,缓慢加至稀释血液 1/2 体积的 Ficoll-Paque™ PREMIUM 分离液液面,1 450 r/min 离心 20 min;离心后,自上而下第 2 层(乳白色细胞层)即为单核细胞,最底层为红细胞;将单核细胞转移至新的离心管后,用 3 倍体积的 37 °C 预热 PBS 冲洗 2 次,4 °C 下 1 600 r/min 离心 10 min 后计数备用;将红细胞转移至新的离心管后,加入 2 倍体积的 37 °C 预热 PBS,1 000 ~ 1 500 r/min 离心 10 min,重复用 PBS 冲洗 1 次后备用。

抗菌肽对人红细胞的溶血性根据已报道的方法<sup>[11]</sup>进行。用 PBS 将新鲜分离的人红细胞稀释至 1%,取 90 μL 加至 96 孔细胞培养板各孔中;将抗菌肽储备液进行 2 倍系列稀释,最高浓度为最高待测浓度的 10 倍,取 10 μL 抗菌肽稀释液加至相应红细胞孔中,同时设置阳性对照孔(加入 10 μL 1% Triton X-100)和空白对照孔(加入 10 μL PBS),每个样品设 3 个平行孔;将培养板置于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 环境中培养 24 h;培养结束后,将培养板 1 500 r/min 离心 20 min,吸取上清至一新平底透明 96 孔培养板中,用酶标仪测定各孔在 414 nm 下的吸光度;不同浓度抗菌肽对人红细胞的溶血率采用如下公式计算:红细胞溶血率(%) = 100 × (试验孔 OD<sub>414 nm</sub> - 空白对照孔 OD<sub>414 nm</sub>) / (阳性对照孔 OD<sub>414 nm</sub> - 空白对照孔 OD<sub>414 nm</sub>)。实验重复 3 次,取平均值。

### 1.5 人外周血淋巴细胞增殖率分析

抗菌肽对人 PBMC 增殖的影响参照 WST-1 试剂说明书进行。将分离纯化的 PBMC 用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基稀释至 2 × 10<sup>6</sup>/mL,90 μL/孔接种至 96 孔培养板,置于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养 2 h;抗菌肽储备液分别稀释至 10 倍待测浓度后,取 10 μL 加至培养 2 h 后的各细胞孔中,同时设置空白对照孔(加入 10 μL 细胞培养液)和 Triton X-100 对照孔,每个样品至少 3 个平行孔;将细胞继续置于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养 24 h 后,向 Triton X-100 对照孔中加入终浓度为 2% Triton X-100,并用移液器吹打混匀,继续培养 15 min;各孔加入 10 μL 细胞增殖剂 WST-1 后,继续将细胞置于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养后,将 96 孔培养板置于振荡器上震荡混匀 1 min;用酶标仪测定各孔在 450 nm 下的吸光度,采用以下公式计算抗菌肽对人 PBMC 增殖的影响:细

胞增殖率(%) = 100 × (试验孔 OD<sub>450 nm</sub> - Triton-X 100 孔 OD<sub>450 nm</sub>) / (空白对照孔 OD<sub>450 nm</sub> - Triton-X 100 孔 OD<sub>450 nm</sub>)。实验重复 3 次,取平均值。

### 1.6 细胞毒性分析

细胞毒性分析按 LDH 检测试剂盒说明进行操作。将分离纯化的 PBMC 用含 1% FBS 的 RPMI 1640 培养基稀释至 2 × 10<sup>6</sup>/mL,100 μL/孔接种细胞培养板,置于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养 2 h 后,加入 10 μL 待测抗菌肽至终浓度分别为 400、200、100 和 50 μg/mL,每个样品设置 3 个平行孔,同时设置背景对照孔、细胞自发释放 LDH 孔和细胞最大释放 LDH 孔;将细胞继续置于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养 24 h;向最大释放 LDH 孔中加入终浓度为 0.2% Triton X-100,并用移液器吹打混匀,继续培养 15 min;培养结束后,2 000 r/min 离心 10 min,转移 50 μL 细胞上清至透明平底 96 孔培养板中,加反应底物,5 ~ 25 °C 震荡避光培养 30 min,测定各孔在 490 nm 下的吸光度;抗菌肽对 PBMC 的细胞毒性百分率(%) = 100 × (试验孔 OD<sub>490 nm</sub> - 自发释放孔 OD<sub>490 nm</sub>) / (最大释放孔 OD<sub>490 nm</sub> - 自发释放孔 OD<sub>490 nm</sub>)。实验重复 3 次,取平均值。

### 1.7 细胞膜去极化分析

抗菌肽对大肠杆菌细胞膜去极化的作用分析采用抗生素敏感型突变株 *E. coli* UB1005 和细胞膜电势敏感性荧光染料 DiSC<sub>3</sub>(5),根据已报道的方法<sup>[12]</sup>进行。将过夜培养的 *E. coli* UB1005 转接至新鲜的 MH 肉汤培养基,37 °C 下 200 r/min 恒温震荡培养 1 ~ 3 h 至 OD<sub>600 nm</sub> = 0.5,3 000 r/min 转速下离心 10 min,加缓冲液(5 mmol/L HEPES,5 mmol/L 葡萄糖,pH 7.4)将菌体沉淀混匀后离心,用相同缓冲液悬浮细胞至 OD<sub>600 nm</sub> = 0.05;准备好的菌悬液中加入终浓度为 0.8 μmol/L 的 DiSC<sub>3</sub>(5) 储存液,室温避光震荡孵育 1 ~ 1.5 h;加入终浓度为 200 mmol/L 的 KCl 储存液,室温避光震荡孵育 15 ~ 30 min;取上述菌悬液 2 mL 至荧光光度计的石英比色杯中,在 622 nm 激发光波长、670 nm 发射光波长、10 nm 狭缝宽度条件下测定荧光释放量 100 s,加入待测抗菌肽至终浓度为所需浓度,检测荧光强度,直至荧光强度不再增加;用加入抗菌肽后荧光强度的变化来反映细菌细胞膜通透性的变化。

### 1.8 数据处理

采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行处理与分析,结果以平均值 ± 标准差表示,以  $P < 0.05$  为差

异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 猪乳铁蛋白肽 LFP-20 及其改良肽的抗菌活性

猪乳铁蛋白肽 LFP-20 及其改良肽 LF2A、LF-

1、LF-3 对几种革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的 MIC 见表 2。与 LFP-20 比较, LF2A 对 5 种试验菌株的抗菌活性没有提高;改良肽 LF-1、LF-3 对 5 种试验菌株的抗菌活性提高了 2~4 倍, LF-3 的抗菌活性最强。

表 2 LFP-20 及其改良肽的体外最小抑菌浓度

Table 2 *In vitro* minimum inhibitory concentrations of LFP-20 and its analogs

名称 Name	最小抑菌浓度 MIC/( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )				
	<i>E. coli</i>	<i>S. choleraesuis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
	ATCC 25922	CMCC 50020	CMCC 50013	ATCC 25923	C621
LFP-20	64	128	64	64	128
LF2A	64	128	64	64	>256
LF-1	32	64	32	32	32
LF-3	16	32	64	32	64

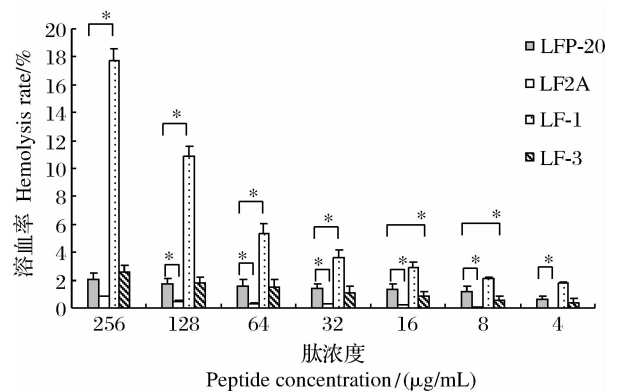
### 2.2 猪乳铁蛋白肽 LFP-20 及其改良肽对人红细胞的溶血作用

不同浓度的 LFP-20、LF2A、LF-1 和 LF-3 对人红细胞的溶血作用如图 1 所示, 4 种抗菌肽的溶血作用均随着浓度升高有所增加;模板肽 LFP-20 的溶血率较低, 在 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时对人红细胞的溶血率仅为 2.42%;改良肽 LF2A 对人红细胞的溶血率低于模板肽 LFP-20, 在 4~128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时差异显著 ( $P < 0.05$ );而与 LFP-20 相比, LF-1 的溶血率在 32~256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时显著升高 ( $P < 0.05$ ), 在 4~16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时有所升高, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ );与 LFP-20 相比, LF-3 的溶血作用在不同浓度时的变化不一致, 8 和 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LF-3 溶血率显著降低 ( $P < 0.05$ ), 在 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 32~256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时的变化差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

### 2.3 猪乳铁蛋白肽 LFP-20 及其改良肽对人 PBMC 增殖率的影响

不同浓度 LFP-20、LF2A、LF-1 和 LF-3 对人 PBMC 增殖的影响见图 2。与模板肽 LFP-20 相比, 等于或低于 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LF2A、LF-1 和 LF-3 均可促进 PBMC 增殖, 25~100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LF-1 对 PBMC 增殖率具有显著促进作用 ( $P < 0.05$ ), 但 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LF-1 却显著降低了 PBMC 的增殖率 ( $P < 0.05$ );此外, 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LF2A 对 PBMC 的增殖也有一定的抑制作用, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ );在检测的浓度范围内 (25~400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), LF-3 对 PBMC 增殖的影响与模板肽 LFP-20 相比均

没有显著性差异 ( $P > 0.05$ )。



\* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。下图同。Asterisk means significant difference ( $P < 0.05$ ). The same as below.

图 1 不同浓度猪乳铁蛋白肽 LFP-20 及其改良肽对人红细胞的溶血率

Fig. 1 The percentage hemolysis of porcine lactoferricin LFP-20 and its analogs at different concentrations to human erythrocyte

### 2.4 猪乳铁蛋白肽及其改良肽对人 PBMC 的细胞毒性

用常规 LDH 释放法测定不同浓度 LFP-20、LF2A、LF-1、LF-3 对人 PBMC 的细胞毒性结果如图 3 所示。4 种抗菌肽对 PBMC 的细胞毒性均随浓度的升高而增强;与模板肽 LFP-20 相比, 25 和 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LF-1 显著降低了对 PBMC 的细胞毒性 ( $P < 0.05$ ), 但在 200 和 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 对 PBMC 的细胞

毒性显著高于 LFP-20 ( $P < 0.05$ ); 400  $\mu\text{g/mL}$  LF-3 对 PBMC 的细胞毒性也显著升高 ( $P < 0.05$ ), 而在 25 ~ 200  $\mu\text{g/mL}$  范围内, LF-3 对 PBMC 的细胞毒性与 LFP-20 相比没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。

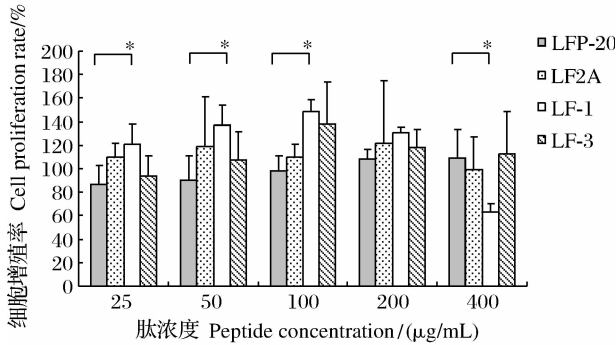


图2 不同浓度猪乳铁蛋白肽 LFP-20 及其改良肽对人 PBMC 增殖的影响

Fig.2 Effects of porcine lactoferricin LFP-20 and its analogs at different concentrations on the proliferation of human PBMC

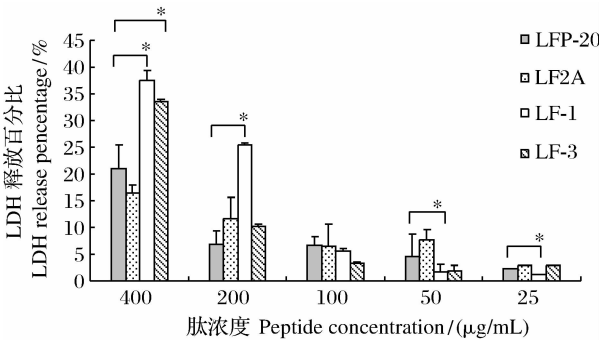


图3 不同浓度猪乳铁蛋白肽 LFP-20 及其改良肽对人 PBMC 的细胞毒性

Fig.3 The cytotoxicity of porcine lactoferricin LFP-20 and its analogs at different concentrations to human PBMC

### 2.5 猪乳铁蛋白肽及其改良肽对大肠杆菌细胞膜的去极化作用分析

不同浓度 LFP-20、LF2A、LF-1、LF-3 对 *E. coli* UB1005 细胞膜的去极化作用见图 4。荧光探针 DiSC<sub>3</sub>(5) 是一种带有一个短的 (C<sub>3</sub>) 烷基尾部阳离子染料, 能够聚集在超极化的细胞膜上, 进而易位进入脂质双分子层。 *E. coli* UB1005 是细胞膜通透屏障缺陷型突变株, 其细胞膜电势在缓冲液中 KCl 的作用下维持在超极化状态, 使 DiSC<sub>3</sub>(5) 能够聚集在细菌细胞膜内; 此时, 高浓度的 DiSC<sub>3</sub>(5) 发生自我

淬灭不能发出荧光。当外源抗菌肽在细胞膜上产生离子通道, 则会使得细菌细胞膜电势被打乱, 发生去极化作用, DiSC<sub>3</sub>(5) 被释放到缓冲液中发出荧光, 通过比较荧光强弱, 即可判断抗菌肽对细胞膜去极化作用的强弱。图 4 的结果表明, 4  $\mu\text{g/mL}$  的 LFP-20 对细菌细胞膜几乎没有去极化作用, 而 LF2A、LF-1、LF-3 则使得荧光强度不断升高, LF-3 对细菌细胞膜的去极化作用最强; 在 8、16 和 32  $\mu\text{g/mL}$  时, 4 种抗菌肽对细菌细胞膜的去极化作用也具有类似结果, 8 和 16  $\mu\text{g/mL}$  的 LFP-20 和 LF-1 对细菌细胞膜的去极化作用相差无几, 而 LF-3 的去极化作用则明显高于另外 3 种肽; 在 32  $\mu\text{g/mL}$  时, LF-3 对细菌细胞膜的去极化作用最强, LF-1 次之, LF2A 的去极化作用最轻, 甚至低于模板肽 LFP-20。

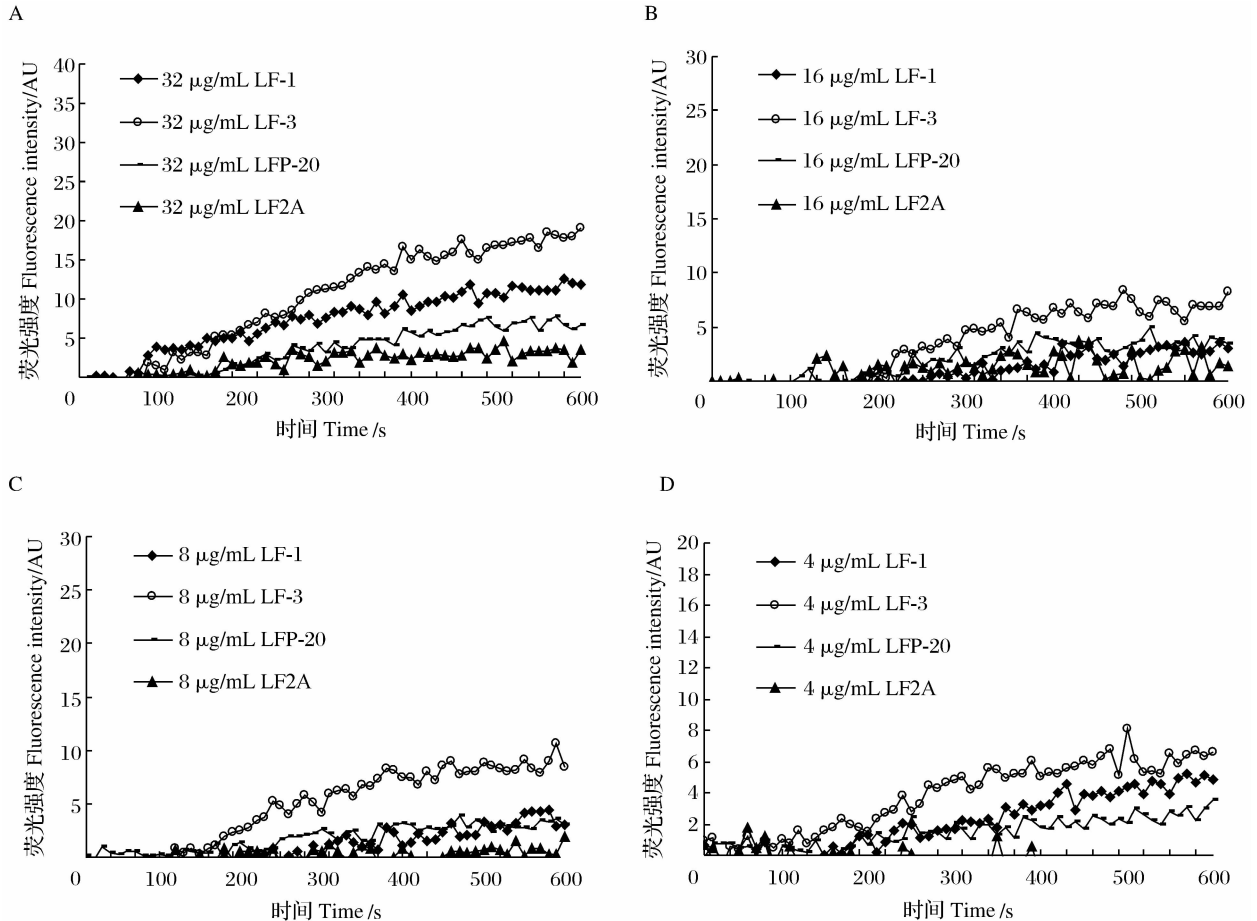
### 3 讨论

抗菌肽以其高效、广谱、抗菌机理独特等优点<sup>[13-14]</sup> 日益成为最具开发前景的新型抗菌药物。然而天然的抗菌肽并非完美无缺, 有些抗菌肽对真核细胞有一定毒性, 在对病原微生物发挥高效杀灭作用的同时, 往往伴随着对真核细胞的溶血作用或细胞毒性。因此, 如何提高其活性和最大程度降低其毒性成为抗菌肽分子改造的目的, 也是目前抗菌肽药物开发的难点和希望所在。研究表明, 疏水性、正电荷、二硫键以及两亲性是与阳离子抗菌肽抗菌活性密切相关的重要性质, 抗菌肽类似物的设计大多是围绕着对这几种性质的改变或修饰来进行的<sup>[15]</sup>。本研究以线性猪乳铁蛋白肽 LFP-20 为模板, 通过序列中 2 个 Cys → Ala、2 个 Ile → Trp 的替换, 以及 4 个氨基酸残基的同时替换来研究 Ala 和 Trp 对猪乳铁蛋白肽抗菌活性、溶血作用以及对真核细胞毒性的影响, 同时对其通过破坏细菌细胞膜电势, 形成离子通道而发挥抗菌作用的机制进行了初步研究。

本研究中, 将猪乳铁蛋白肽 LFP-20 第 2 位和第 17 位 Cys 替换为 Ala 后 (LF2A), 其对 5 种试验菌株的抗菌活性未发生显著变化, 表明 Cys 并不是影响 LFP-20 抗菌活性的重要位点, Ala 没有提高其抗菌活性, 但却在 4 ~ 128  $\mu\text{g/mL}$  范围内显著降低了其对人红细胞的溶血作用。但 Wu 等<sup>[9]</sup> 对牛中性粒细胞中发现的抗菌肽 bactenecin 衍生物的研究中发现, 将分子中 2 个 Cys 形成的二硫键还原使得空间结构由环形变为线性后, 该抗菌肽对革兰氏阳性菌

具有很好的选择性,而对大肠杆菌、绿脓杆菌和鼠伤寒沙门氏菌等革兰氏阴性菌的抗菌活性消失;将 2 个 Cys 用 2 个 Ala 或者 Ser 代替,改良后的抗菌肽 Bac 2A 和 Bac 2S 获得了比线性 bactenecin 更强的

抗菌活性。虽然同样是对 Cys 的替换,抗菌活性的变化却不尽相同,说明上述抗菌肽的抗菌活性不仅仅与单一位点的氨基酸有关,而是由整个抗菌肽分子空间结构和性质所决定的。



图中数据为 3 次重复试验的代表。

Data are representative of three independent experiments.

图 4 猪乳铁蛋白肽 LFP-20 及其改良肽对 *E. coli* UB1005 细胞膜的去极化作用分析

Fig. 4 The cytoplasmic membrane depolarization of *E. coli* UB1005 by porcine lactoferrin LFP-20 and analogs

Trp 残基在抗菌肽发挥抗菌活性过程中的重要性已经被众多研究所证实<sup>[16-17]</sup>。Strøm 等<sup>[6]</sup>采用甘氨酸扫描法——即用 Ala 逐一替代含 15 个氨基酸残基的 Lfcin B 的研究发现,其分子中第 6 位和第 8 位的 Trp 是维持其抗菌活性所必需的;将来源于人、猪和骆驼的同源序列第 8 位氨基酸替换为 Trp 后,对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌活性提高。对 Lfcin B 的研究发现,该抗菌肽可以通过与原核细胞膜上的负电荷基团产生静电吸引而与质膜结合,在这一过程中,Lfcin B 分子中的 Trp 作用最为重要;Trp 的芳香族环结构可以与磷脂头部的甘油

相互作用,带动整个 Lfcin 与质膜结合,从而进一步发挥抗菌作用<sup>[18]</sup>。本研究中,将 LFP-20 第 9 位和第 18 位的 Ile 替换为 Trp 后(LF-1),其对 5 种试验菌株的 MIC 值降低了 2~4 倍,验证了芳香族氨基酸 Trp 能够增加抗菌肽抗菌活性的能力;但芳香族氨基酸比例增加了的改良肽 LF-1 对人红细胞的溶血作用也有所提高,特别是在 32 µg/mL 浓度以上时,其溶血率显著高于模板肽 LFP-20。显著增强的溶血作用将严重限制抗菌肽作为抗生素替代产品的开发和应用,因此,本研究设计了改良肽 LF-3,即同时将 LFP-20 分子中的 2 个 Cys 和 2 个 Ile 分别用

Ala 和 Trp 替换。抗菌活性分析结果表明,改良肽 LF-3 对 5 种试验菌株的抗菌活性与改良肽 LF-1 相当,是 LFP-20 的 2~4 倍;其对人红细胞的溶血作用在 4~256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内却显著降低或没有发生显著变化。

除了对红细胞的溶血作用,对真核细胞的毒性也是反映抗菌肽分子是否具有副作用的重要性质。本研究采用 WST-1 法和 LDH 释放法研究了猪乳铁蛋白肽 LFP-20 及其改良肽 LF2A、LF-1 和 LF-3 对 PBMC 增殖的影响和细胞毒性。结果发现,在 25、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,将 Ile 替换为 Trp 后显著提高了 PBMC 的增殖率;但当浓度到达 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  后,将 Ile 替换为 Trp 则显著降低了 PBMC 的增殖率。上述结果表明 Ala 或/和 Trp 的替换对真核细胞 PBMC 增殖的影响具有剂量依赖性,在一定浓度范围内不产生抑制作用。4 种肽对 PBMC 细胞毒性的研究结果发现,Cys 替换为 Ala 后,细胞毒性仅在 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时显著升高;Ile 替换为 Trp 后,细胞毒性在高浓度(200、400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 时显著升高;而在 25~400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内,4 种氨基酸残基的同时替换未对细胞毒性产生显著性影响。

抗菌肽能够通过几种不同途径来达到其对微生物的抗菌作用<sup>[19-20]</sup>。通常情况下,抗菌肽首先通过静电作用选择性地与细菌细胞膜上带负电荷的磷脂头部相互作用而触发抗菌作用;这种相互作用的一个可能结果就是细菌细胞膜电势的变化<sup>[21]</sup>。本研究利用细胞膜敏感性荧光探针 DiSC<sub>3</sub>(5) 来测定了猪乳铁蛋白肽 LFP-20 及其改良肽对细菌细胞膜电势梯度的破坏作用。研究结果发现,在 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,4 种抗菌肽的抗菌活性与它们对细菌细胞膜的去极化作用存在一定关系,即对细胞膜去极化作用强的抗菌肽具有较低的 MIC 值,但这种相关关系在 4、8、16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时表现并不明显,推测可能是因为肽浓度较低,不能打破细菌细胞膜电势梯度的平衡;4、8、16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的模板肽 LFP-20 均表现出了最低的细胞膜去极化作用;改良肽 LF-3 在 4 种浓度时均表现出了最强的细胞膜去极化作用,这与 4 种肽中 LF-3 具有对大肠杆菌最低的 MIC 值相一致。上述研究结果表明,达到一定浓度后 4 种抗菌肽对细胞膜均产生去极化作用,但去极化作用的强弱与其抗菌活性并不完全相关,只有达到一定浓度后,这种对细菌细胞膜去极化作用越强的抗菌肽抗菌活性越强的关系才能够成立。

## 4 结 论

① 猪乳铁蛋白肽 LFP-20 第 2 位和第 17 位的 Cys 替换为 Ala 后,其抗菌活性变化不大,溶血作用显著降低,在 100~400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时对真核细胞的细胞毒性没有增强。

② 猪乳铁蛋白肽 LFP-20 第 9 位和第 18 位的 Ile 替换为 Trp 后,其抗菌活性提高了 2~4 倍,但在 32~256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内溶血作用和对真核细胞的细胞毒性显著增强。

③ 同时将猪乳铁蛋白肽 LFP-20 第 2 位和第 17 位的 Cys 替换为 Ala、第 9 位和第 18 位的 Ile 替换为 Trp 后,其抗菌活性提高了 2~4 倍,32~256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内的溶血作用和对真核细胞的毒性没有显著增强。

④ 猪乳铁蛋白肽 LFP-20 及其改良肽 LF2A、LF-1、LF-3 在高浓度时均可影响大肠杆菌细胞膜电势梯度的平衡,使得细胞膜发生去极化作用,细胞膜上形成离子通道,推测对细胞膜的去极化作用可能是这几种抗菌肽发挥抗菌作用的途径之一。

## 参考文献:

- [1] GIFFORD J L, HUNTER H N, VOGEL H J. Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2005, 62: 2588-2598.
- [2] STRØM M B, REKDAL O, SVENDSEN J S, et al. The effects of charge and lipophilicity on the antibacterial activity of undecapeptides derived from bovine lactoferricin [J]. Journal of Peptide Science, 2002, 8(1): 36-43.
- [3] HWANG P M, ZHOU N, SHAN X, et al. Three-dimensional solution structure of lactoferricin B, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin [J]. Biochemistry, 1998, 42(3): 388-392.
- [4] VOGEL H J, SCHIBLI D J, JING W, et al. Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine-containing peptides [J]. Biochemistry, 2002, 80: 49-63.
- [5] HUNTER H N, DEMCOE A R, JENSSEN H, et al. Human lactoferricin is partially folded in aqueous solution and is better stabilized in a membrane mimetic solvent [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(8): 3387-3395.

- [ 6 ] STRØM M B, REKDAL O, SVENDSE J S. Antibacterial activity of 15-residue lactoferricin derivatives[J]. *Journal of Peptide Research*, 2000, 56: 265 – 274.
- [ 7 ] STRØM M B, HAUG B E, REKD M Q, et al. Important structural features of 15-residue lactoferricin derivatives and methods for improvements of antimicrobial activity[J]. *Biochemistry*, 2002, 80:65 – 74.
- [ 8 ] CHEN H L, YEN C C, LU C Y, et al. Synthetic porcine lactoferricin with a 20-residue peptide exhibits antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54: 3277 – 3282.
- [ 9 ] WU M, HANCOCK R E W. Improved derivatives of bactenecin, a cyclic dodecameric antimicrobial cationic peptide[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999, 43(5):1274 – 1276.
- [ 10 ] WIEGAND I, HILPERT K, HANCOCK R E W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3:163 – 175.
- [ 11 ] YANG S T, SHIN S Y, HAHM K S, et al. Design of perfectly symmetric Trp-rich peptides with potent and broad-spectrum antimicrobial activities[J]. *The International Journal of Antimicrobial Agents*, 2006, 27(4):325 – 330.
- [ 12 ] POWERS J P S, ROZEK A, HANCOCK R E W. Structure-activity relationships for the beta-hairpin cationic antimicrobial peptide polyphemusin I[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1698:239 – 250.
- [ 13 ] GIACOMETTI A, CIRIONI O, DELPRETE M S, et al. Combination studies between polycationic peptides and clinically used antibiotics against gram-positive and gram-negative bacteria [J]. *Peptides*, 2000, 21: 1155 – 1160.
- [ 14 ] JENSSEN H, HAMILL P, HANCOCK R E W. Peptide antimicrobial agents clinical[J]. *Microbiology Reviews*, 2006, 19:491 – 511.
- [ 15 ] 张兰廷,刘忠渊,张富春. 抗菌肽结构与功能关系及分子改造研究进展[J]. *生物技术*, 2008, 18(5):89 – 92.
- [ 16 ] VOGEL H J, SCHIBLI D J, JING W, et al. Towards a structure function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan and arginine-containing peptides[J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 2002, 80:49 – 63.
- [ 17 ] TIAN Z G, TENG D, YANG Y L, et al. Multimerization and fusion expression of bovine lactoferricin derivative LfcinB15-W4,10 in *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 75: 117 – 124.
- [ 18 ] SCHIBILI D J, VOGEL P M, HANS J. The structure of the antimicrobial active center of lactoferricin B bound to sodium dodecyl sulfate micelles [J]. *FEBS Letters*, 1999, 446:213 – 217.
- [ 19 ] ZASLOFF M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms[J]. *Nature*, 2002, 415:389 – 395.
- [ 20 ] KOCZULLA A R, BALS R. Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential [J]. *Drugs*, 2003, 63:389 – 406.
- [ 21 ] MATSUZAKI K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, 1462:1 – 10.



## Molecular Improvement of Porcine Lactoferricin and Biological Activity of the Modified Peptides

HAN Feifei AN Sha XIE Yonggang LIU Yifan WANG Yizhen\*

(Institute of Feed Science, Key Laboratory for Molecular Animal Nutrition of Ministry of Education, Key Laboratory for Feed and Animal Nutrition of Zhejiang Province, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract:** In this study, porcine lactoferricin LFP-20 and its analogs were prepared by chemical synthesis with an aim to understand structure-function relationships of these peptides and thereby to obtain improved analogs. The minimum inhibitory concentration (MIC) measured by broth microdilution method and hemolytic analysis showed that the 20-residue porcine lactoferricin (LFP-20) and its analogs LF2A, LF-1, and LF-3 displayed the antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. The minimum inhibitory concentrations of LFP-20 ranged from 64 to 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and LF-1 and LF-3 were 2 to 4 times more effective than LFP-20. The studies demonstrated that the analog LF2A, replacing the 2- and 17- Cys of LFP-20 with Ala, did not show increased activities against bacteria, but exhibited decreased hemolytic activity. The analog LF-1, replacing the 9-and 18- Ile of LFP-20 with Trp, showed improved antimicrobial activity. But the hemolytic activity of LF-1 was also increased at 4, 32, 64, 128, and 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $P < 0.05$ ). The cytotoxic potential of LFP-20 analogs was quantified by colorimetric WST-1 and LDH assays in peripheral blood mononuclear cell (PBMC). LF2A, LF-1 and LF-3 increased cell proliferation and viability in a dose dependent fashion. Compared with LFP-20, 25 to 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LF-1 improved significantly cell proliferation ( $P < 0.05$ ), while 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LF-1 decreased cell proliferation ( $P < 0.05$ ). Both 200 and 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LF-1 induced an increase in lactate dehydrogenase (LDH) release from PBMC ( $P < 0.05$ ) whereas 25 to 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  decreased the LDH release ( $P < 0.05$ ). Moreover, LF-3 exhibited obviously enhanced potential to depolarize the cytoplasmic membranes at relatively low concentrations (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). In contrast, LFP-20 and LF2A had more modest antibacterial activities, and a weaker ability to depolarize the cytoplasmic membrane. In conclusion, the antimicrobial activity of LF-3 is found to be 2 to 4 folds higher than that of LFP-20, which dose not couple with increased hemolysis and cytotoxicity to PBMCs. Moreover, LF-3 can disrupt the membrane potential by depolarizing the bacterial membrane, which is proposed to be one of the mechanisms of action of LF-3. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2011, 23(2):241-249]

**Key words:** porcine; lactoferricin; antimicrobial activity; hemolytic activity; cytotoxicity

\* Corresponding author, professor, E-mail: yzwang@zju.edu.cn