

文章编号: 1000-7423(2014)-05-0377-04

【综述】

抗菌肽抗寄生虫作用研究进展

刘泽华, 赵俊龙*

【提要】 抗菌肽是由生物体内特定基因编码、核糖体合成的一类小分子活性多肽, 具有高效、抗菌谱广和免疫原性低等特点。研究发现, 抗菌肽可抑制寄生虫生长发育甚至杀死寄生虫, 有潜在的抗寄生虫应用价值。本文综述了近年来有关抗菌肽抗寄生虫作用的研究进展, 并介绍了抗菌肽研究中存在的问题。

【关键词】 抗菌肽; 原虫; 蠕虫; 作用机制

中图分类号: R38 文献标识码: A

Progress on Parasitocidal Activity of Antimicrobial Peptides

LIU Ze-hua, ZHAO Jun-long*

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

【Abstract】 Antimicrobial peptides are a kind of gene encoded, ribosome synthesized, small molecular polypeptides that have high efficiency, wide antibacterial spectrum, and low immunogenicity. Many studies have indicated that antimicrobial peptides can inhibit the growth of parasites or even kill them. This paper reviews the research progress on parasitocidal activity of the antimicrobial peptides in recent years, and presents the problems in the research.

【Key words】 Antimicrobial peptide; Protozoa; Helminth; Mechanism

* Corresponding author, E-mail: zhaojunlong@mail.hzau.edu.cn

寄生虫病严重危害人类和动物的健康, 对人类公共卫生安全构成了严峻的挑战, 并且制约畜牧业的发展。目前, 抗寄生虫治疗仍以化学药物为主, 但由于化学药物不良反应和耐药性虫株出现, 开发新型抗寄生虫药物迫在眉睫。抗菌肽是由多种因素诱导而产生的一类阳离子活性多肽, 广泛存在于自然界, 是固有免疫的重要防御成分, 一般由 10~60 个氨基酸组成, 免疫原性低, 热稳定性好, 在较大的离子强度和较低或较高的 pH 值下仍可保持较高强度的活性, 某些抗菌肽甚至具有抵抗蛋白酶水解的能力^[1]。同时, 抗菌肽具有抗菌、抗寄生虫、抗病毒和抗肿瘤等多种生物学功能, 并且以其广谱、快速及作用机制特殊等特点, 被视为最有希望替代传统药物的新药制剂, 成为国内外研究的热点。

1 抗菌肽的抗寄生虫作用

1989 年, Gwadz 等^[2]的研究发现, 蛙皮素 (magainin) 和天蚕素 (cecropin) 2 类抗菌肽能抑制疟原虫生长, 这是首次发现抗菌肽具有抗寄生虫作用。近年来, 多种抗菌肽陆续被分离和鉴定, 其抗寄生虫作用

也有所不同。

1.1 抗原虫作用 原虫为单细胞真核生物。有研究表明, 抗菌肽对疟原虫、锥虫和利什曼原虫等多种原虫均有抑制作用。

1.1.1 抗疟原虫作用 Gwadz 等^[2]利用蛙皮素和天蚕素 2 类抗菌肽作用于感染食蟹猴疟原虫 (*Plasmodium cynomolgi*) 的冈比亚按蚊 (*Anopheles gambiae*), 发现疟原虫的卵囊和子孢子发育均受到抑制。Tian 等^[3]用一种昆虫抗菌肽 drosomycin (20 $\mu\text{mol/L}$) 体外作用于伯氏疟原虫 (*P. berghei*) 配子体, 抑制率达 70%。另有实验发现, 伯氏疟原虫动合子经另一种昆虫抗菌肽 gambicin (10 $\mu\text{mol/L}$) 体外作用 24 h, 致死率达 54.6%^[4]。天蚕素类合成肽 shiva-3 (75~100 $\mu\text{mol/L}$) 可有效减少体外伯氏疟原虫动合子的产生及白端按蚊 (*An. albimanus*) 中虫体的感染数量, 且在疟原虫发育早期的 8 h 内, 经 shiva-3 (100 $\mu\text{mol/L}$) 作用 50 s 后即可完全抑制其发育^[5]。研究结果提示, 抗菌肽主要作用于疟原虫发育的早期阶段, 具有阶段特异性。从牛嗜铬粒蛋白 A 中提取的儿茶酚抑素 (catestatin, 20 $\mu\text{mol/L}$) 作用于恶性疟原虫 (*P. falciparum*) 氯喹敏感株 3D7、氯喹抗性株 7G8 和 W2, 抑制率分别为 88%、64% 和 62%。转基因埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*)

作者单位: 华中农业大学, 农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

* 通讯作者, E-mail: zhaojunlong@mail.hzau.edu.cn

体内表达抗菌肽防御素 A (defensin A) 后, 可抑制体内鸡疟原虫 (*P. gallinaceum*) 的增殖, 抑制率达 85%^[7]。

1.1.2 抗锥虫作用 布氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*) 感染中间宿主刺舌蝇 (*Glossina morsitans*) 后, 经反相色谱法、质谱法、Edman降解法和体外抗菌测定法, 检测到其血淋巴液中有天蚕素、攻击素 (attacin) 和防御素等3种抗菌肽^[8]。之后, 金小宝等^[9]研究发现, 这3种抗菌肽在家蝇各生长阶段的表达水平存在差异, 但均普遍表达, 说明抗菌肽在家蝇的免疫防御体系和生长发育中发挥着重要作用。Fieck等^[10]观察到, 克氏锥虫 (*T. cruzi*) 经蜜蜂肽 (apidaecin, 199 $\mu\text{mol/L}$)、天蚕素 A (80 $\mu\text{mol/L}$)、蛙皮素 2 (33 $\mu\text{mol/L}$)、蜂毒素 (melittin, 30 $\mu\text{mol/L}$) 或家蚕抗菌肽 moricin (10 $\mu\text{mol/L}$) 作用 96 h, 死亡率均为 100%。50 $\mu\text{mol/L}$ 的人源抗菌肽 β -防御素 1、 β -防御素 2、鼠防御素 (cryptdin-4)、猪源抗菌肽 protegrin-1、绵羊骨髓抗菌肽 (SMAP-29) 或其衍生物 novispirin 和 ovispirin 作用于布氏锥虫上鞭毛体 3 h, 抑制率分别为 29.6%、17.8%、33.1%、81.3%、86.3%、95.0% 和 95.2%^[11]。

1.1.3 抗利什曼原虫作用 抗利什曼原虫活力测定实验发现, 将昆虫抗菌肽 decoralin 作用于硕大利什曼原虫 (*Leishmania major*) 前鞭毛体 6 h, 半数抑制剂量为 72 $\mu\text{mol/L}$, 将该抗菌肽 C 端酰胺化修饰后, 即 deco-ralin-NH₂, 对硕大利什曼原虫前鞭毛体的半数抑制剂量仅 11 $\mu\text{mol/L}$, 抑制效率大大提高^[12]。天蚕素/蜂毒素的杂合肽 CA(1-8)M(1-18) (1.3 $\mu\text{mol/L}$) 作用于杜氏利什曼原虫 (*L. donovani*) 前鞭毛体 2 h, 死亡率达 100%^[13]。蛙类抗菌肽 temporin A (8.4 $\mu\text{mol/L}$) 和 temporin B (8.6 $\mu\text{mol/L}$) 作用于杜氏利什曼原虫前鞭毛体 1 h, 死亡率均为 50%^[14]。

1.1.4 抗其他原虫作用 人源抗菌肽 α -防御素 5 和昆虫抗菌肽 longicin P4 在 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下分别作用于刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 速殖子, 发育抑制率均达到 90%^[15,16]。Omata 等^[17]将 1×10^5 个弓形虫速殖子经乳铁素 B (lfcin B, 1 000 $\mu\text{g/ml}$) 孵育 1 h 后感染小鼠, 对照组 5 只小鼠 14 d 时即死亡 4 只, 24 d 时全部死亡, 而实验组的 5 只小鼠存活时间均超过 30 d。

体外实验发现, 昆虫抗菌肽 longicin (1 $\mu\text{mol/L}$) 即可完全抑制马巴贝虫 (*Babesia equi*) 裂殖子发育, 而将其截短获得的抗菌肽 longicin P4 (5 $\mu\text{mol/L}$) 可完全抵御马巴贝虫入侵红细胞; 体内实验中, 按 3 mg/kg longicin 的剂量治疗感染马巴贝虫的小鼠, 小鼠发生虫血症的比例减少 40%^[18]。

体外实验结果表明, 噬菌体抗菌肽 PW2 可抑制堆形艾美球虫 (*Eimeria acervulina*) 和柔嫩艾美球虫 (*E. tenella*) 子孢子的发育^[19]。Omata 等^[17]利用乳铁素 B 与斯氏艾美球虫 (*E. stiedai*) 子孢子孵育, 发现其感染兔肝胆管细胞后, 细胞内虫体数量减少, 进一步的动物实验结果显示, 孵育过的子孢子感染家兔后, 兔粪便中球虫卵囊数量亦大幅减少。

1.2 抗蠕虫作用 植物环形肽环状紫菌素 (cycloviolacin) 家族和卡拉塔 (kalata) 家族中的一系列抗菌肽在体外实验中均对捻转血矛线虫 (*Haemonchus contortus*) 幼虫和蛇形毛圆线虫 (*Trichostrongylus colubriformis*) 幼虫具有杀灭作用, 且环状紫菌素 O2 (cycloviolacin O2) 和环状紫菌素 O14 对捻转血矛线虫成虫的作用效果显著优于卡拉塔 B1^[20]。

另有体外实验结果显示, 卡拉塔 B1 (12.53 $\mu\text{mol/L}$)、卡拉塔 B6 (3.32 $\mu\text{mol/L}$) 和环状紫菌素 O14 (1.17 $\mu\text{mol/L}$) 均可完全抑制犬钩口线虫 (*Ancylostoma caninum*) 第 III 期幼虫的生长发育。此外, 卡拉塔 B1 (45.29 $\mu\text{mol/L}$) 和环状紫菌素 O14 (11.56 $\mu\text{mol/L}$) 亦可完全抑制美洲板口线虫 (*Necator americanus*) 第 III 期幼虫的生长发育^[21]。

曼氏血吸虫 (*Schistosoma mansoni*) 成虫经 75 $\mu\text{g/ml}$ 蛙类抗菌肽 dermaseptin-01 作用 24 h, 即可完全抑制雌虫产卵, 浓度为 200 $\mu\text{g/ml}$ 作用 24 h 后, 成虫死亡率达 100%^[22]。

2 抗菌肽抗寄生虫的作用机制

抗菌肽抗寄生虫作用机制尚未明确, 有可能是多种机制的联合作用。根据抗菌肽对寄生虫作用部位的不同, 可分为膜攻击性机制和胞内杀伤机制。

2.1 膜攻击性机制 抗菌肽主要是通过“毯式模型”、“虫孔模型”或“凝聚模型”作用于寄生虫细胞质膜, 破坏质膜形态, 形成离子通道或出现暂时的孔洞, 导致膜的完整性破坏和功能丧失, 造成细胞崩解或死亡^[23]。50 $\mu\text{mol/L}$ α -防御素 5 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下与弓形虫速殖子共孵育 1 h, 电镜下观察发现, 胞膜出现环形孔洞, 胞质外溢, 导致速殖子丧失入侵小鼠胚胎细胞和巨噬细胞的能力^[16]。Diaz-Achirica 等^[13]研究结果显示, 杂合肽 CA(1-8)M(1-18) (1.3 $\mu\text{mol/L}$) 即可在杜氏利什曼原虫前鞭毛体膜上形成 H⁺/OH⁻ 通道, 导致膜电位丧失, 细胞膜发生形态学改变, 进而引起其他细胞器发生改变, 最终导致虫体死亡。

2.2 胞内杀伤机制 抗菌肽可以通过影响胞内细胞器、核酸及物质转运等方式杀伤寄生虫^[23]。Kulkarni 等^[24]研究发现, 一些抗菌肽可以通过改变线粒体膜电

位,活化半胱氨酸蛋白酶3等方式诱导细胞凋亡,导致利什曼原虫死亡。人源抗菌肽 α -防御素1浓度达到30 $\mu\text{mol/L}$ 时,可杀死克氏锥虫滋养体和无鞭毛体,研究发现,细胞膜出现孔隙,微管断裂,线粒体膜电位发生变化、肿胀,尔后核DNA断裂^[25]。抗菌肽硫链丝菌素(thiostrepton)可以作用于恶性疟原虫核糖体RNA大亚基的三磷酸鸟苷(GTP)酶结合区域,抑制孢子发育^[26]。

综上所述,抗菌肽既可通过攻击损伤胞膜,又可利用胞内杀伤机制发挥抗寄生虫作用。目前,在抗菌肽发挥生物活性的过程中这两种机制是否联合作用,还需进一步研究验证。

3 抗菌肽研究存在的问题及抗寄生虫作用前景

虽然抗菌肽具备抗多种病原微生物的功能,且应用前景广阔,但在实验研究抗菌肽抗寄生虫作用中还有很多问题亟待解决:①来源问题,分离天然抗菌肽成本高,资源有限且提取困难,人工合成未经修饰或经修饰的抗菌肽,但价格昂贵,基因工程方法表达量少同时活性受到影响^[27],因此,抗菌肽来源问题成为目前抗菌肽研究和应用的瓶颈;②抗菌肽使用安全性,许多抗菌肽在高浓度下有溶血作用,对哺乳动物正常细胞有一定毒性,在抗菌肽体内实验中,会对哺乳动物正常细胞造成损伤,难以准确分析实验结果;③关于抗菌肽的药理、药效、药代动力学和毒理学等方面研究较少,极大地限制了其在实验研究和临床上的运用;④抗菌肽体内稳定性问题,多肽类物质在体内涉及到许多酶化学反应,由于抗菌肽一级结构中含有多个碱性氨基酸残基,经口服或注射途径进入体内后,容易被胰蛋白酶降解而使抗菌活性降低,也可与体内某些蛋白质结合最终使其丧失抗菌活性,设计开发同时具有抗菌活性与胰蛋白酶抑制剂活性的双功能多肽可以作为一种新方法解决蛋白酶水解问题;⑤抗菌肽保存问题,各种来源的抗菌肽均存在活性容易降解的问题,目前常采用冻干粉的方法进行保存,然而使用过程中不合理的溶解会造成抗菌肽的损失和实验的失败,同时冻干粉或已溶解的抗菌肽需防止被氧化,保存过程较繁琐。

多年来,抗菌肽的研究主要集中在抗细菌、抗真菌、抗病毒和抗肿瘤作用,对抗寄生虫作用研究较少。自然界中存在大量进化保守的抗菌肽,目前发现抗菌肽对多种寄生虫均有抑制作用,以这些抗菌肽资源,利用现代分子生物学技术,进行人工设计改造和

合成新型抗菌肽制剂应用于寄生虫病的预防治疗,可能有良好的发展前景。

参 考 文 献

- [1] 代玉华,霍红杰,王怀位,等. 抗菌肽抗疟原虫作用的研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2010, 28(6): 455-458.
- [2] Gwadz RW, Kaslow D, Lee JY, et al. Effects of magainins and cecropins on the sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes[J]. Infect Immun, 1989, 57(9): 2628-2633.
- [3] Tian C, Gao B, Rodriguez Mdel C, et al. Gene expression, antiparasitic activity, and functional evolution of the drosomycin family[J]. Mol Immunol, 2008, 45(15): 3909-3916.
- [4] Vizioli J, Bulet P, Hoffmann JA, et al. Gambicin: a novel immune responsive antimicrobial peptide from the malaria vector *Anopheles gambiae* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(22): 12630-12635.
- [5] Rodriguez MC, Zamudio F, Torres JA, et al. Effect of a cecropin-like synthetic peptide (Shiva-3) on the sporogonic development of *Plasmodium berghei*[J]. Exp Parasitol, 1995, 80(4): 596-604.
- [6] Akaddar A, Doderer-Lang C, Marzahn MR, et al. Catestatin, an endogenous chromogranin A-derived peptide, inhibits *in vitro* growth of *Plasmodium falciparum* [J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67(6): 1005-1015.
- [7] Kokoza V, Ahmed A, Woon Shin S, et al. Blocking of *Plasmodium* transmission by cooperative action of cecropin A and defensin A in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(18): 8111-8116.
- [8] Boulanger N, Brun R, Ehret-Sabatier L, et al. Immuno-peptides in the defense reactions of *Glossina morsitans* to bacterial and *Trypanosoma brucei brucei* infections [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2002, 32(4): 369-375.
- [9] 金小宝,王艳,朱家勇,等. 家蝇生长发育各阶段抗菌肽基因表达情况的研究 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2008, 26(3): 187-190.
- [10] Fieck A, Hurwitz I, Kang AS, et al. *Trypanosoma cruzi*: Synergistic cytotoxicity of multiple amphipathic anti-microbial peptides to *T. cruzi* and potential bacterial hosts [J]. Exp Parasitol, 2010, 125(4): 342-347.
- [11] McGwire BS, Olson CL, Tack BF, et al. Killing of African trypanosomes by antimicrobial peptides[J]. J Infect Dis, 2003, 188(1): 146-152.
- [12] Konno K, Rangel M, Oliveira JS, et al. Decoralin, a novel linear cationic alpha-helical peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Oreumenes decorates*[J]. Peptides, 2007, 28(12): 2320-2327.
- [13] Diaz-Achirica P, Ubach J, Guinea A, et al. The plasma membrane of *Leishmania donovani* promastigotes is the main target for CA(1-8)M(1-18), a synthetic cecropin A-melittin hybrid peptide [J]. Biochem J, 1998, 330(Pt 1): 453-460.
- [14] Mangoni ML, Saugar JM, Dellisanti M, et al. Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity [J]. J Biol Chem, 2005, 280(2): 984-990.
- [15] Tanaka T, Maeda H, Matsuo T, et al. Parasiticidal activity of *Haemaphysalis longicornis* longicin P4 peptide against *Toxoplasma gondii*[J]. Peptides, 2012, 34(1): 242-250.
- [16] Tanaka T, Rahman MM, Battur B, et al. Parasiticidal activity of human alpha-defensin-5 against *Toxoplasma gondii*[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2010, 46(6): 560-565.
- [17] Omata Y, Satake M, Maeda R, et al. Reduction of the infectivity of *Toxoplasma gondii* and *Eimeria stiedai* sporozoites by treatment with bovine lactoferricin[J]. J Vet Med Sci, 2001, 63

- 504-514.
- [35] Folarin OA, Bustamante C, Gbotosho GO, *et al.* *In vitro* amodiaquine resistance and its association with mutations in *pfert* and *pfmdr1* genes of *Plasmodium falciparum* isolates from Nigeria[J]. *Acta Tropica*, 2011, 120(3): 224-230.
- [36] Price RN, Cassar C, Brockman A, *et al.* The *pfmdr1* gene is associated with a multidrug-resistant phenotype in *Plasmodium falciparum* from the western border of Thailand [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(12): 2943-2949.
- [37] Fidock DA, Nomura T, Talley A, *et al.* Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein *PfCRT* and evidence for their role in chloroquine resistance [J]. *Mol Cell*, 2000, 6(4): 861-871.
- [38] Afonso A, Hunt P, Cheesman S, *et al.* Malaria parasites can develop stable resistance to artemisinin but lack mutations in candidate genes *atp6* (encoding the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase), *tctp*, *mdr1*, and *cg10* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(2): 480-489.
- [39] Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, *et al.* A molecular marker of artemisinin resistant *Plasmodium falciparum* malaria [J]. *Nature*, 2014, 505(2): 50-55.
- [40] Stepniewska K, Ashley E, Lee SJ, *et al.* *In vivo* parasitological measures of artemisinin susceptibility [J]. *J Infect Dis*, 2010, 201(4): 570-579.
- [41] Breman JG. Resistance to artemisinin-based combination therapy [J]. *Lancet Infect Dis*, 2012, 12(11): 820-822.
- [42] Kolaczinski J, Macdonald M, Meek S. Vector control to eliminate artemisinin resistant malaria in the Greater Mekong subregion[J]. *Lancet Infect Dis*, 2014, 14(1): 9-11.
- [43] WHO. Emergency response to artemisinin resistance in the Greater Mekong subregion[R]. Geneva: WHO, 2013.
- (收稿日期: 2014-05-20 编辑: 瞿麟平)

(上接第 379 页)

- (2): 187-190.
- [18] Rahman MM, Tsuji N, Boldbaatar D, *et al.* Structural characterization and cytolytic activity of a potent antimicrobial motif in longicidin, a defensin-like peptide in the tick *Haemaphysalis longicornis*[J]. *J Vet Med Sci*, 2010, 72(2): 149-156.
- [19] Arnaldo S, Kawazoe U, Freitas FF, *et al.* Avian anticoccidial activity of a novel membrane-interactive peptide selected from phage display libraries[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2002, 120(1): 53-60.
- [20] Colgrave ML, Kotze AC, Ireland DC, *et al.* The anthelmintic activity of the cyclotides: natural variants with enhanced activity [J]. *ChemBiochem*, 2008, 9(12): 1939-1945.
- [21] Colgrave ML, Kotze AC, Kopp S, *et al.* Anthelmintic activity of cyclotides: *In vitro* studies with canine and human hookworms [J]. *Acta Trop*, 2009, 109(2): 163-166.
- [22] de Moraes J, Nascimento C, Miura LM, *et al.* Evaluation of the *in vitro* activity of dermaseptin 01, a cationic antimicrobial peptide, against *Schistosoma mansoni* [J]. *Chem Biodivers*, 2011, 8(3): 548-558.
- [23] Park Y, Hahn KS. Antimicrobial peptides (AMPs): peptide structure and mode of action[J]. *J Biochem Mol Biol*, 2005, 38(5): 507-516.
- [24] Kulkarni MM, McMaster WR, Kamysz W, *et al.* Antimicrobial peptide-induced apoptotic death of *Leishmania* results from calcium-dependent, caspase-independent mitochondrial toxicity [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(23): 15496-15504.
- [25] Madison MN, Kleshchenko YY, Nde PN, *et al.* Human defensin alpha-1 causes *Trypanosoma cruzi* membrane pore formation and induces DNA fragment ation leading to trypanosome destruction [J]. *Infect Immun*, 2007, 75(10): 4780-4791.
- [26] Sullivan M, Li J, Kumar S, *et al.* Effects of interruption of apicoplast function on malaria infection, development, and transmission[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2000, 109(1): 17-23.
- [27] 魏泉德, 余新炳. 抗菌肽的原核表达及应用前景[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2006, 33(4): 206-210.
- (收稿日期: 2014-01-24 编辑: 瞿麟平)

感谢寄生虫病科研、防治、教学工作
多年来对本刊的大力支持！欢迎继续投稿！