

抗菌素在生化研究过程中的应用

郭兴华 王清海

(中国科学院微生物研究所)

一、前言

抗菌素作用机理的研究和分子生物学的发展是相辅相成的。分子生物学的发展为从分子水平上研究抗菌素的药理学提供了研究方法,从而把这门科学由细胞水平导向了分子水平,形成了分子药理学;抗菌素又为分子生物学的研究提供了良好的工具。例如 Temin 发现反转录酶,或 RNA 指导的 DNA 多聚酶,主要就是利用了放线菌素 D。

研究抗菌素作用方式大概有以下几种方法:①利用同位素或发荧光基团标记的抗菌素,观察抗菌素与细胞结合的部位;②研究抗菌素和特异的酶所发生的反应;③研究存在抗菌素时细胞中间代谢产物的累积;④添加某种药物解除抗菌素的抑制作用;⑤比较敏感菌和耐药菌之间的生化差异;⑥改变抗菌素的结构并与原抗菌素比较;⑦用光学显微镜和电子显微镜观察形态变化;⑧研究不同抗菌素对大分子掺入核酸或蛋白质的影响等。

抗菌素作为生化代谢的抑制剂,可以用于研究以下生化过程:核酸合成;蛋白质合成;细胞壁合成;细胞质膜的功能和能量代谢等。

二、核酸合成

1. DNA 的复制

(1) 复制过程 在原核细胞中,染色体 DNA 多是环状的,由两条 DNA 单链象麻花一样缠绕在一起,形成双螺旋结构。DNA 复制是从引发点开始,沿着染色体 DNA 两个相反方向进行的。随着亲链渐渐解开,多聚酶以各种脱氧核苷三磷酸为底物进行复制,新复制的子链

以亲链为模板,边复制边缠绕,最后亲、子两代 DNA 互相分开。复制是通过一个或多个 DNA 多聚酶完成的,即酶分子迅速从 5' → 3' 的方向通过 DNA,接着就有 10,000 个左右小片段形成。每个新的小片段与另一个新的小片段通过 DNA 连接酶共价连接起来。整个复制过程发生在细胞质膜的特异的“复制器”上。在此过程中,无疑是由“复制器”把 DNA 多聚酶、DNA 连接酶和一些尚未鉴定的酶协调得有条不紊,这个“复制器”也可能对子链和亲链复合体的转动起一定的作用。

在真核细胞中,染色体 DNA 的复制不是在细胞质膜,而是在细胞核里进行的。

(2) 抑制 DNA 复制的抗菌素 有不少抗菌素抑制核酸的合成,其中多数是和 DNA 分子形成复合体。它们大部分是抗肿瘤抗菌素。

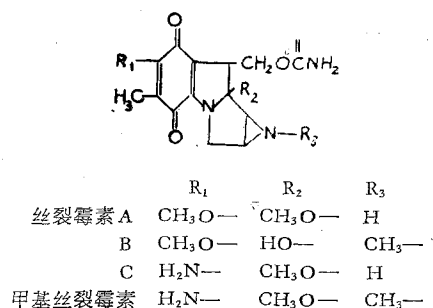


图 1 丝裂霉素族抗菌素的化学结构

丝裂霉素 C (它与我国的自力霉素相似): 丝裂霉素的化学结构如图 1 所示。在丝裂霉素的分子中,存在着氮丙啶、氮甲酰胺和氮甲脒三个活性基团,前两个基团具有烷化功能,因而被视为抗菌素中有双功能团的烷化剂,其主要作用是使 DNA 双螺旋体的两条互补链之间形成交

联,从而抑制 DNA 的复制。在一定浓度时,丝裂霉素可以不直接影响 RNA 和蛋白质的合成。丝裂霉素 C 在细胞内可以被还原,这种还原型的活性中间体已经找到。在体外,一分子还原型丝裂霉素 C 可与 500 个分子的脱氧核苷酸相结合。

博莱霉素(它与我国的争光霉素相似):它的原始作用是和 DNA 中核苷酸进行稳定的或不稳定的结合,单链 DNA 比双链 DNA 结合抗菌素的量大约要多一倍。当存在巯基化合物或过氧化氢时,抗菌素与 DNA 结合被显著促进,从而切断其单股链,抑制胸腺嘧啶掺入到 DNA 中去,停止细胞的有丝分裂。另外,博莱霉素又是通过与 DNA 反应而引起后者熔点下降的一种抗菌素,这是由于它使核酸结构松散造成的。许多抗菌素,如下面提到的腐草霉素、放线菌素 D 和蒽霉素等都是使 DNA 熔点增高,即增加了 DNA 的结构稳定性。它们都抑制 DNA 的复制或转录,而博莱霉素 A₂ 在这点上和它们有很大的区别。

腐草霉素可抑制 DNA 多聚酶 I, 溶肉瘤素也有类似作用。

此外,新制癌素,伊短菌素和萘里酸等抗菌素也都是 DNA 合成的抑制剂。

2. 转录——RNA 的合成

(1) 转录过程 转录分两种:一种是在模板 DNA、核苷三磷酸及 Mg^{+2} 等存在下,在一定的环境中,由依赖于 DNA 的 RNA 多聚酶合成 RNA;另一种是在模板 RNA 和脱氧核苷三磷酸及 Mg^{+2} 等存在下,在一定的环境中,由反转录酶合成 DNA。因为后者是以 RNA 为模板合成 DNA, 所以称为反转录。

转录时, DNA 局部解开双链,随着 DNA 多聚酶的移动, DNA 前面渐渐解开,后面渐渐缠绕, RNA 在合成后与 DNA 脱离。通常一个操纵子为一个转录单位,一个操纵子由一个或几个顺反子组成,它可翻译若干种蛋白质,在操纵子片段的一端有启动子,它是 RNA 多聚酶附着和开始转录的位点。在体内,环状的 DNA 只有一股有意义的链(可能是含胞嘧啶和尿嘧啶多

的一条链)被转录,在体外,则两条链都可被转录。

(2) 抑制转录的抗菌素 抗菌素抑制 RNA 合成的作用可以分两类。第一类是:与 DNA 形成复合体,阻止依赖于 DNA 的 RNA 多聚酶在 DNA 链上的移动,因而阻止了 RNA 的合成(在高浓度下也抑制 DNA 的合成)。典型的例子就是放线菌素 D, 其结构如图 2。

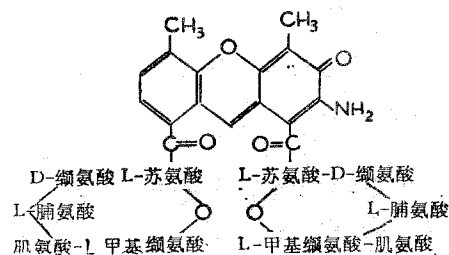


图 2 放线菌素 D 的结构

因为它的分子中包含有氨基醌这类发色基团和多肽,所以,与 DNA 的作用是通过发色基团的氨基及醌的氧原子与双链 DNA 的鸟嘌呤脱氧核苷酸形成氢键(发色基团掺入 DNA 双螺旋中),形成了 DNA-放线菌素的复合体从而抑制了转录。在此反应中,放线菌素分子所含的多肽显然也起着重要的作用。该素作用的特点是它只能与双股 DNA 形成稳定的复合体,而不与单股 DNA 作用。它与 DNA 结合的程度取决于 DNA 中含鸟嘌呤的量,抗菌素与 DNA 的结合,可通过吸收光谱的改变来发现。

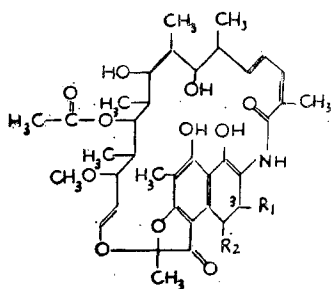
在研究大分子的代谢中,放线菌素 D 是一个重要的工具,因为它抑制以 DNA 为模板的 DNA 多聚酶和以 DNA 为模板的 RNA 多聚酶(后者比前者更为敏感),而不抑制以 RNA 为模板的 DNA 多聚酶或 RNA 多聚酶,所以现已应用于:①鉴定未知系统中 RNA 合成是否以 DNA 为媒介;②区别以 DNA 为模板的 DNA 多聚酶和以 RNA 为模板的 DNA 多聚酶;③区别某些 DNA 噬菌体和 RNA 噬菌体。利用它能特异地和双股 DNA 形成复合体的性质,可以区别单股 DNA 病毒或噬菌体(不抑制其复制)和双股 DNA 病毒或噬菌体(抑制其复制);④用于研究

激素的作用和器官组织的分化；⑤因为放线菌素 D 存在时不产生新的 mRNA，所以如有诱导酶产生的话，可断定诱导酶的合成是在翻译水平，而不是在转录水平。

喹啉族的抗菌素在性质上和放线菌素接近。其中棘霉素或左霉素等也抑制依赖于 DNA 的 RNA 合成。

属于金霉素族的色霉素、橄榄霉素和光神霉素(我国的光辉霉素类似于该抗菌素)之作用原理十分相似，它们的作用机理和放线菌素 D 差不多，也是与 DNA 形成稳定的复合体，有选择地抑制细菌和哺乳动物细胞 RNA 的合成，与放线菌素不同的是这三种抗菌素仅在存在 Mg^{+2} 存在时，才与 DNA 反应。尽管这些抗菌素都可能在同一结合点上与 DNA 分子发生反应，但彼此之间又有若干差异。

抑制 RNA 合成的第二类抗菌素是作用于依赖 DNA 的 RNA 多聚酶，从而抑制 RNA 的合成，而不是作用于 DNA 模板。力复霉素及其衍生物力复平是这类抗菌素中研究得最广泛的一种，不论作为药物用于临床，还是作为工具用于生化研究，它都有重要价值。力复霉素的化学结构如图 3。



力复霉素 B $R_1=H$, $R_2=O-CH_2COOH$

力复平 $R_1=CH=N-N<N-CH_3$, $R_2=OH$

力复霉素 SV, $R_1=N<N-O$, $R_2=OH$

图 3 力复霉素类的化学结构

力复霉素类抗菌素分子的环桥结构对于杀菌活力有重要的作用。实验证明，力复霉素特异地和 RNA 多聚酶结合，从而抑制 RNA 链合成的起动 (rRNA、tRNA 和 mRNA 合成同样受

到抑制)，如果是抗力复霉素的菌株，则因酶中 β -肽链产生突变，不会和力复霉素结合，RNA 的合成便不受抑制。3-呱啉力复霉素 SV 的浓度较低 (1—10 微克/毫升) 时，耐药性金黄色葡萄球菌的出现率为力复平的 1%，但是前者浓度在 200 微克/毫升时，对该菌的 RNA 多聚酶仍无影响。大量的实验指出，改变力复霉素 C-3 部位的环桥结构能抑制耐药性菌株的出现，C-3 部位换上环己胺则抑制 RNA 肿瘤病毒，诱发细胞转化。

由于力复霉素在结构和功能方面具有特异性，现已用于：①帮助区别以 DNA 为模板的不同来源的 RNA 多聚酶。因为力复平对真核细胞中的 RNA 多聚酶无作用，而对细菌、线粒体和叶绿体中依赖于 DNA 的 RNA 多聚酶有作用，所以一般可以借此区别。不过应该指出，在体外，鼠肝线粒体 RNA 多聚酶对力复平是敏感的，而在体内却不敏感，这可能是由于这种抗菌素不能通透线粒体膜有关。②帮助区别细菌中以 DNA 为模板的 RNA 多聚酶和 RNA 肿瘤病毒中以 RNA 为模板的 DNA 多聚酶(反转录酶)。对力复霉素的结构与功能的研究指出，力复霉素分子中大环中的 C-3 部位的环桥结构能“识别”上述两种多聚酶的共同结构，但二者对 C-3 位取代基团要求不同，细菌中依赖于 DNA 的 RNA 多聚酶要求支链，RNA 病毒中以 RNA 为模板的 DNA 多聚酶则要求较大的基团；③用于质体 (R 因子，大肠杆菌素因子和温和噬菌体)、附加体 (如 F'-Lac) 等小环 DNA 的研究。力复平在低于杀菌的浓度下，能消除金黄色葡萄球菌的青霉素酶因子，大肠杆菌素 E_1 因子及沙门氏菌 R 因子的传递，同时也能除去大肠杆菌中 F'-Lac 附加体，但对抗力复平的大肠杆菌中的质体和附加体来说，在菌能生长的抗菌素浓度下，它们并不被消除。上述质体和附加体之所以能消除，可能是由于力复平和 RNA 多聚酶作用后，不能提供合成小环 DNA 所需的 RNA 引子所造成的。④区别两种 DNA 多聚酶，已知放线菌素 D 能抑制以 DNA 为模板的 DNA 多聚酶，而不能抑制以 RNA 为模板的 DNA 多聚酶(反转录

酶),但是力复霉素的衍生物正好相反,所以利用这两种抑制剂可以区别属于哪种 DNA 多聚酶。

影响多聚酶功能的还有曲张链丝菌素,它影响 RNA 链的延长。链霉溶菌素及鹅膏霉素等的作用原理和力复平相似。

(3) 抑制 DNA 复制及转录的抗菌素 蒽环类抗菌素是由四环蒽醌的多羟基衍生物蒽环酮和糖苷组成的抗菌素,它也是以发色基团掺入 DNA 双股螺旋中而与 DNA 结合,这类抗菌素包括紫红霉素、异紫红霉素、吡咯霉素、烬灰红菌素、黑胡桃霉素、柔毛霉素及阿德里亚霉素等,其中以柔毛霉素(我国的正定霉素与它相似)最为重要,它的结构如图 4。这类抗菌素也抑制依赖于 DNA 的 RNA 多聚酶,从而抑制 RNA 的合成,然而蒽环类抗菌素又有其特殊性:①与 DNA 结合时,似乎不存在碱基特异性;②在抑制 RNA 多聚酶的同时也抑制依存于 DNA 的 DNA 的多聚酶,故 DNA 的合成往往同时受到抑制,但对后者的抑制要强些。

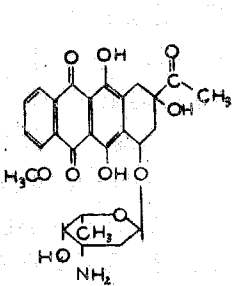


图 4 柔毛霉素的化学结构

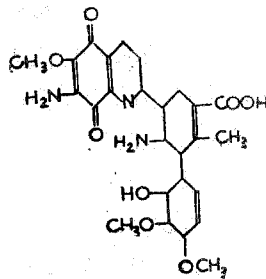


图 5 链霉黑素的化学结构

链霉黑素:它的化学结构如图 5,分子中也有氨基醌的结构,这种结构对保持其生物活性是重要的,置换伯氨基或改变醌型结构可导致失活,但只具有氨基醌结构本身(结构式左上部)也没有活性。1 分子链黑霉素估计能与 2,000 分子脱氧核苷酸稳定结合,它抑制 DNA 的复制和转录,对生物有多种效应。

此外,蒽霉素也能与 DNA 螺旋进行稳定的共价结合,从而阻止 DNA 作为参与 DNA 和 RNA 生物合成的模板,使 DNA 和 RNA 的合成受到同样的抑制。

总结前面所述,我们把一些干扰核酸合成的抗菌素列表如下(表 1)。

表 1 干扰核酸合成的一些抗菌素

抑制 DNA 复制	抑制 转 录	抑制复制和转录
丝裂霉素	放线菌素 D	柔毛霉素
甲基丝裂霉素	色 霉 素	黑胡桃菌素
博来霉素	橄榄霉素	紫红霉素
腐草霉素	光神霉素	异紫红霉素
新制癌素	左 霉 素	吡咯霉素
溶肉瘤素	力复霉素	蒽 霉 素
伊短菌素	力 复 平	链霉黑素
蔡里酸	冬虫夏草菌素	嗜 癌 素
Sibiromycin	远 霉 素	阿德里亚霉素
	曲张链丝菌素	
	链霉溶菌素	
	鹅膏霉素	

另外,有些抗菌素对释放噬菌体或抑制噬菌体繁殖有明显的影响。如丝裂霉素、新制癌素、链霉黑素、博来霉素、蔡里酸、Lyomycin 和 Sibiromycin 等对细菌释放噬菌体有作用,而放线菌素、远霉素和力复平也抑制噬菌体的繁殖,后者对于 RNA 噬菌体的作用更为显著。

三、蛋白质合成

1. 翻译——蛋白质的合成

遗传信息贮存于双股 DNA 链的碱基序列之中,通过转录传递到 mRNA 上,信息的最后表现则是把 mRNA 中碱基的序列转变为蛋白质中氨基酸的序列,因为二者结构不同,文字各异,所以称之为翻译。翻译过程,即蛋白质合成过程可用图 6 表示。

I. 信使 RNA 附着在 30S 核糖核蛋白体亚基上,附着点是接近于信使 RNA 顺反子的 5' 末端,起动因子 IF-2 和 IF-3 促动核苷酸附着。

II. 起动的氨酰基-tRNA 附着于 30S 亚基-信使 RNA 复合体上,这一过程要求 GTP, IF-1 和 IF-2。

III. 50S 核糖核蛋白体亚基附着于起动的复合体上。

IV. 通过一系列的替换步骤, GDP 从延长因子 EF-Tu 复合体脱离,换上 GTP。然后氨酰

基-tRNA 加上去, 变成 $EF-Tu \cdot GTP \cdot aa_1-tRNA$ 复合体, 为第 V 步提供条件。

V. 肽链延长。由 $EF-Tu \cdot GTP \cdot aa_1-tRNA$ 复合体形成氨酰基-tRNA, 并伴随有 GTP 的水解。

VI. 肽转移酶或肽合成酶的作用。肽转移酶 (可能是 50S 核糖核蛋白体的一部分), 催化肽链形成, 导致在 A 位产生新生肽链。

VII. 转位作用。在延长因子 EF-G 和 GTP 存在下, 信使 RNA 和核糖核蛋白体彼此相对移动, 信使 RNA 附着于下一个密码的位置上。G 因子活化 GTP 酶使参与核糖核蛋白体移动的

GTP 水解, 原附着于 P 位的去氨酰基 tRNA 被释放出来, 这样使新生肽链位于核糖核蛋白体 P 位。

VIII. 通过重复 IV 和 VII 步骤, 将氨基酸加到新生肽链的羧基端。

IX. 在信使 RNA 上出现终止信号 (uAG, uAA 或 uGA) 时, 释放因子和这个密码子结合 (RF_1 和 uAA 或 uAG 结合, RF_2 和 uAA 或 uGA 结合), 于是已完成的肽链、信使 RNA 及携带肽链羧基末端氨基酸的 tRNA 一起从核蛋白体上释放出来, RF_3 促进这个释放反应。

X. 核糖核蛋白体解离。在解离因子 (DF)

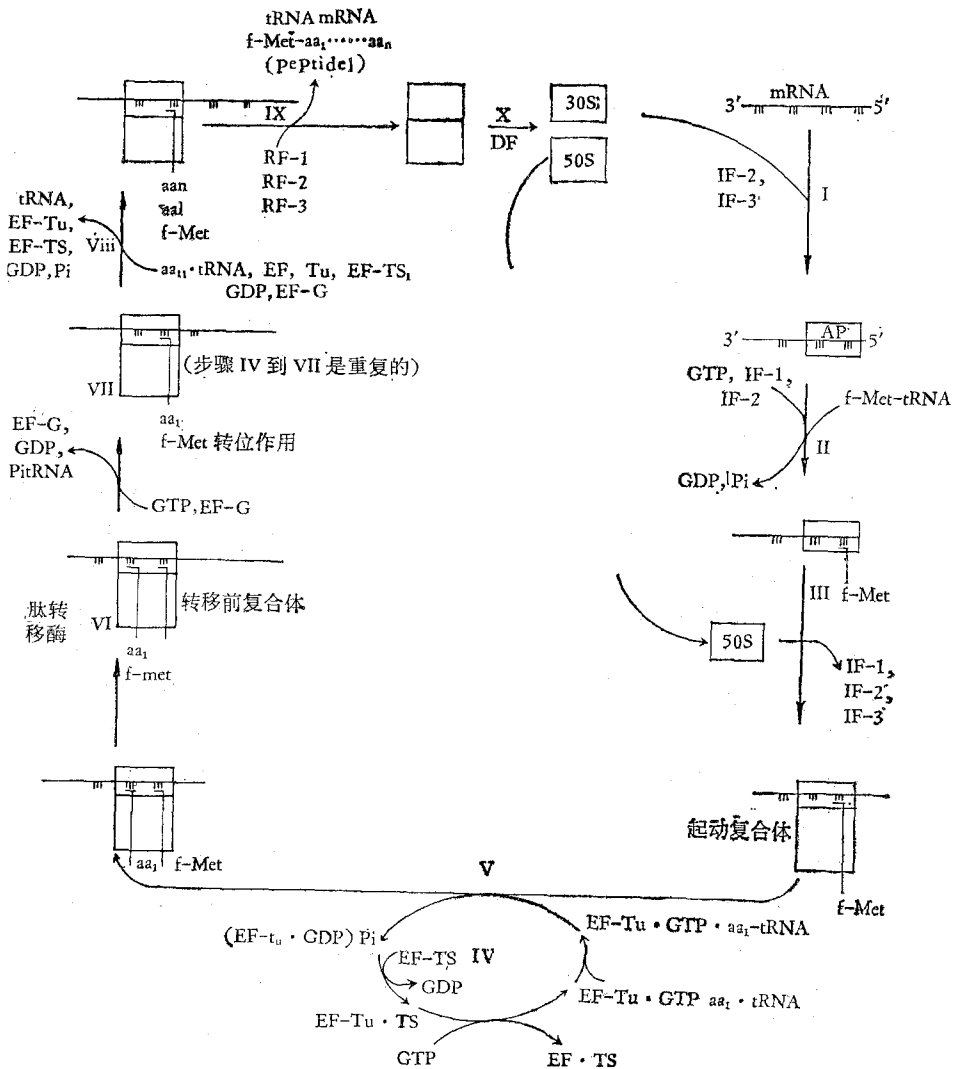


图 6 细菌核糖核蛋白体合成蛋白质的图解

(可能是启动因子 IF-3) 存在下,核糖核蛋白体解离为亚基。

2. 抑制蛋白质合成的抗菌素

(1) 抑制氨酰基-tRNA 形成的抗菌素 如上所述,氨基酸必须先被特异的酶活化后,才能附着于 tRNA 上被 tRNA 所运送。疏螺旋素是特异抑制苏氨酸-tRNA 活化的抑制剂,由于抗菌素的抑制作用,导致了原核细胞(大肠杆菌)和真核细胞(啤酒酵母)中蛋白合成的停止。

(2) 抑制氨酰基-tRNA 和核糖核蛋白体-tRNA 复合体结合的抗菌素 春日霉素(和我国春雷霉素相似)特异地抑制这一步。

(3) 作用于 30S 亚基的抗菌素 氨基糖苷类抗菌素作用于核糖核蛋白体 30S 亚基,这类抗菌素包括链霉素、卡那霉素、新霉素、巴龙霉素、艮它霉素(我国庆大霉素近似于该素)和潮霉素。Nomura 和 Gorini 对链霉素作用的机制进行了深入研究,现已证明,链霉素附着于核糖核蛋白体 30S 的 P 位点,引起 tRNA 反密码子错读 mRNA 的密码子,从而导致氨基酸错误地掺入新生的肽链中,形成无用的蛋白质,造成菌的死亡。实验证明:在抗链霉素的突变菌中(指染色体突变后引起的抗性,而不是含质体 R 因子的抗性),核糖核蛋白体 P 位蛋白有所改变,链霉素不再能附着。

还应说明,链霉素只对于细菌核糖核蛋白体 30S 有作用,而对于哺乳动物无作用,四环素对于细菌和哺乳动物离体的核糖核蛋白体相等能同样地附着,但在体内则因它能优先进入完整的细菌细胞,所以利用这些特性可以对细菌性疾病进行药物治疗。

(4) 抑制氨酰基转移的抗菌素 嘌呤霉素和氨酰基-tRNA 的末端结构相似,它作为苯丙氨酰-tRNA 类似物和正常的氨酰基-tRNA 竞争,从而抑制肽链生长,导致过早释放合成得不完全的肽链。同时也可以利用它作为研究转移酶和抗菌素作用方式的方便工具。如果用同位素标记嘌呤霉素并和试验的抗菌素及核糖核蛋白体等一起保温,若同位素在核糖核蛋白体外游离,则说明所试的抗菌素是抑制氨酰基转移的,

实验证明,抗菌素硫酚醇,美加霉素 A 和 B、灭稻瘟素 S 等对嘌呤霉素反应有明显的抑制作用。若同位素仍结合在核糖核蛋白体上,则证明所用抗菌素确实有抑制蛋白质合成的作用,就说明抗菌素是在其他步骤起作用。嘌呤霉素对所有类型的核糖核蛋白体都有抑制作用,因此不能用于治疗疾病。

另外,含嘧啶环的谷氏菌素虽然不能与正在生长的肽链的末端氨基酸形成肽链,但由于竞争性而被中断合成的肽链抑制氨酰基-tRNA 或嘌呤霉素掺入肽链,所以也能抑制肽链生长,不过不能从核糖核蛋白体上释放出来。

(5) 作用于 50S 亚基的抗菌素 氯霉素、林可霉素和大环内酯类抗菌素如红霉素、加沙霉素、螺旋霉素、碳霉素和晶柱白霉素等作用于核糖核蛋白体 50S 亚基。其中研究较深入、用途较广的首推氯霉素,该抗菌素只抑制蛋白质合成(它似乎也干扰肽链转移酶的反应),不干扰其他大分子合成,所以一般作为蛋白质合成的特异抑制剂,用这种抗菌素已成功地证明,氨基酸掺入细胞壁的过程和掺入蛋白质的过程是不同的(参看后面抑制细胞壁合成的抗菌素);还证明 DNA 复制需要有蛋白质等的合成。因为在氯霉素存在下,细菌不能完成核糖核蛋白体的合成,所以它也是研究核糖核蛋白体的合成和装配的有价值的工具;又由于大环内酯类抗菌素竞争性地干扰¹⁴C-氯霉素附着到 50S 亚基上,因此也可用它研究一些抗菌素的分子药理学。

应该说明的是,氯霉素的选择毒性是它只和细菌和高等生物线粒体及叶绿体 50S 核糖核蛋白体结合,而对高等生物 80S 的核糖核蛋白体无作用。

(6) 抑制肽酰基-tRNA 和 mRNA 转位反应的抗菌素 新生肽链由 A 位移到 P 位称为转位。转位反应分酶促转位和非酶促转位两种:

抑制酶转位的主要是类固醇类和抗菌素,如褐霉酸、烟曲霉酸,其中对褐霉酸研究较为深入,一般认为它特异地作用于 G 因子,从而抑制了使 GTP 水解的 GTP 酶,致使肽链不能转位,

蛋白质合成便中断。由表 2 可以看出这个结论。

表 2 褐霉酸对 GTP 酶的活性和合成多肽的影响

核糖核蛋白体	G 因子	GTP 水解 (毫微克分子)		多聚苯丙氨酸的合成 (毫微克分子)	
		-FA	+FA 0.185 mM	-FA	+FA 0.185 mM
S	S	4.97	0.60(88)*	13.2	1.6(88)*
S	R	3.11	2.83(9)	6.4	5.6(13)
R	S	5.02	0.43(91)	9.8	0.7(93)
R	R	3.15	2.81(11)	4.1	3.8(8)

注：*表示抑制率，R 表示抗性，S 表示敏感性，FA 表示褐霉酸

抑制酶促转位和非酶促转位的抗菌素有硫代链霉素和盐霉素等。抑制转位的抗菌素还有小球菌素和波卓霉素，但是它们不抑制 GTP 的水解(表 3)。

表 3 转位抑制剂的分类

抗菌素	细胞成分	酶转位	非酶转位	核糖核蛋白 mRNA 移动	GTP 水解	转肽作用	氨基酸-tRNA 附着
褐霉酸	G 因子	+	-	+	+	-	-
硫代链霉素	核糖核蛋白体	+	+	+	+	+	±
盐霉素							
小球菌素	核糖核蛋白体	+	+	+	-	-	-

注：+ 主要抑制，- 没有效果，± 可能抑制

3. 抗菌素的选择毒性

抗菌素的选择毒性，不仅在临床上应用价值，对分子生物学和分子药理学的研究也有重要意义。

在作用于蛋白质合成的抗菌素中，四环素类、氨基糖苷类(如链霉素)、大环内酯类(如红霉素)、氯霉素类、美加霉素类、林可霉素类等，只作用于细菌核糖核蛋白体，而不作用于动物核糖核蛋白体；而依诺霉素和酚霉素正好相反，它们对动物细胞的核糖核蛋白体作用强，对细菌细胞的核糖核蛋白体作用弱，显示了明显的选择毒性。嘌呤霉素和灭稻瘟菌素 S 等则对两种核糖核蛋白体都有作用，因此选择毒性不明显。

在原核细胞中，四环素类和氨基糖苷类抗菌素是通过对 30S 亚基起作用而抑制蛋白质合成的，林可霉素类和美加霉素类是通过对 50 S 亚基作用而抑制蛋白质合成的。

褐霉酸类是细菌中 G 因子的特异抑制剂，但它对动物细胞中 TF-II 也有作用。

在真核细胞中存在着两种类型的核糖核蛋白体：细胞质中 80 S 的核糖核蛋白体和线粒体、叶绿体中的 70 S 核糖核蛋白体。前者对环己酰亚胺是敏感的，后者不受其作用；反之，后者对细菌蛋白质合成的抑制剂是敏感的，前者则不受其作用。然而褐霉酸对二者都有作用。所以可利用这些抗菌素来区别不同类型的蛋白质合成(表 4)。

表 4 用抗菌素区别不同类型蛋白质的合成

抗菌素	抑制以下蛋白质合成			
	原核细胞	真核细胞		
		细胞质	线粒体	叶绿体
氯霉素	+	-	+	+
红霉素	+	-	+	+
链霉素	+	-	+	+
褐霉素	+	+	+	+
嘌呤霉素	+	+	+	+
环己酰亚胺	-	+	-	-

四、细胞壁合成

1. 细胞壁及其合成

细菌细胞和哺乳动物细胞不同，具有细菌特有的细胞壁，其主要作用是维持细菌体内比外界环境中浓度高数百倍的可溶物质。细菌细胞内的渗透压相当高，金黄色葡萄球菌的内渗透压为 20—25 个大气压，大肠杆菌为 3—5 个大气压。细胞壁可使细菌保持各自的形态。革兰氏阳性球菌细胞壁的主要成分为粘肽占细胞壁总重量的 95%，革兰氏阴性杆菌细胞壁成分较复杂，除粘肽占 1—10% 外，还有脂多糖及脂蛋白等。

大肠杆菌细胞壁粘肽合成共分三步。第一步：尿嘧啶核苷二磷酸作为载体，分别与 N-乙酰-氨基葡萄糖及一种与五肽相连接的 N-乙酰

基粘质酸结合,合成尿二磷-乙酰-葡萄糖胺和尿二磷-乙酰粘质五肽。第二步:二者交替连接,去掉UDP,形成线状糖肽,这个糖肽与细胞膜的磷脂连接,穿过细胞质膜至膜外。它一穿过细胞质膜,糖肽就被受体所接受,继续进行下一步合成,而磷脂则被释放出来,重新进行细胞膜内的磷脂循环。第三步:交联形成与转肽反应,在转肽酶的作用下,糖肽中五肽最末的一个D-丙氨酸被转移掉成为四肽,四肽最末的D-丙氨酸与5聚甘氨酸桥一端的甘氨酸相连接,另外一端的一个甘氨酸则与另外一个糖肽中四肽的赖氨酸相连接形成交联的立体结构,组成网状的粘肽。

2. 抑制细胞壁合成的抗菌素

抑制细胞壁粘肽早期合成的抗菌素有:磷霉素, O-氨基酰-D-丝氨酸和D-环丝氨酸,其中磷霉素抑制 UDP-Glc NAC 丙酮酸转移酶, D-环丝氨酸结构与 D-丙氨酸相似,它竞争性地抑制丙氨酸消旋酶,阻碍 D-丙氨酸-D-丙氨酸二肽的合成。实验证明, D-环丝氨酸和 D-氨基甲酰-D-丝氨酸是研究粘肽合成过程中形成丙氨酸分枝的有效工具。

抑制细胞壁粘肽中期合成的抗菌素有:万古霉素、瑞斯托菌素、Macarbomycin、Monomycin、Prasinomycin、新生霉素和杆菌肽等,这些抗菌素不仅抑制细胞壁合成,且对细胞膜有破坏作用。在细胞壁合成中期,有一步要进行脂质循环,使粘肽挂上磷脂后通过细胞质膜。瑞斯托霉素和万古霉素等是对磷脂中间产物掺入粘肽过程起作用的特异抑制剂,它阻碍合成物越过细胞膜因而不能在细胞膜外发生交联和转肽反应,从而阻止了细胞壁的合成。杆菌肽是焦磷酸化合物的特异抑制剂,它阻止无机磷的释放,使脂质循环中断。

抑制细胞壁后期合成的抗菌素有青霉素和头孢霉素类等。青霉素或头孢霉素的分子结构和粘肽的 D-丙氨酰-D-丙氨酸末端结构类似,可取代合成粘肽的底物而和转肽酶的活性中心结合。因此,如有青霉素存在,则在粘肽合成的最后一步,转肽酶把青霉素误为五肽最末端的

两个氨基酸而与之结合,结果五肽末端丙氨酸未被转肽酶移去,甘氨酸桥一头无法与它前面一个丙氨酸相接,因此交联不能形成,网状结构连接不起来,粘肽合成就不能完成。于是菌体内尿二磷和 N-乙酰基粘质酸便大量堆积。头孢霉素类抗菌素的 7-氨基-头孢霉素酸和青霉素类抗菌素的6-氨基青霉素酸,二者结构相似,抗菌作用机制也一样。

应当指出,青霉素是一种有用的生化研究工具,利用它和氯霉素曾证明氨基酸掺入细胞壁和掺入蛋白质的过程是不一样的,如表5所示。

表 5 青霉素和氯霉素对谷氨酸掺入细胞壁粘肽或蛋白质的抑制

处 理	抑 制 %	
	蛋白质部分	细胞壁部分
氯 霉 素		
葡萄糖和谷氨酸	58	0
葡萄糖和 18 种氨基酸	94	0
青 霉 素		
葡萄糖和谷氨酸	0	91
葡萄糖和 18 种氨基酸	0	78

由表看出,氯霉素只抑制氨基酸掺入蛋白质的过程,对氨基酸掺入细胞壁粘肽的过程无作用,然而青霉素正好相反。

有人对先锋霉素4号(头孢霉素)的作用机制进行了形态学的研究。用电镜观察了 CEX 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的作用,当菌放大到十万倍后可清楚看到细胞各部分构造,在用 CEX 的最低抑菌浓度时,细胞壁肿大,提高药物浓度时,细胞壁便破坏,原生质体明显可见,由于细胞壁破坏,胞内成分外泄,最后只留下细胞质膜。他们的观察结果,在某些方面还纠正了生化研究的错误结论。

另外,抗菌素 polyoxin A 和 B 对真菌细胞壁合成有抑制作用,它们作用于壳质酶,使真菌细胞壁的壳质不能合成。

五、细胞质膜的功能和能量代谢

1. 细胞质膜的功能和抗菌素的抑制作用

(1) 细胞质膜的功能 细胞质膜主要由一层蛋白质和一层脂肪(以磷脂为主)构成,细菌细胞质膜的主要功能是:1.起一种选择性的渗透膜屏障作用,使营养物质如氨基酸、核苷酸及无机盐等能从外界渗入菌体,而不使菌体内物质向外漏出。但细胞质膜本身很脆弱,并不能挡住菌体内很高的内渗压。维持这一内渗压则是细胞壁的作用。2.细胞质膜含有多种酶,是合成核酸和细胞成分的主要场所。

(2) 抗菌素的抑制作用 除了上述抑制细菌细胞壁合成的抗菌素外,还有很多抗菌素可以改变细胞质膜的通透性,破坏细胞质膜功能,导致细胞死亡。多烯类抗菌素:菲律宾菌素、匹马菌素、卡氏菌素、两性霉素B、制霉菌素、N-琥珀酰表霉素、别霉素和曲古霉素等,它们具有双链的大环内酯结构。

多烯类抗菌素的原发作用点是细胞质膜的各类固醇,它使细胞质膜通透性改变、功能缺陷。因为原核细胞质膜无固醇类物质,所以该类抗菌素对细菌一般无作用,而只对真核细胞如真菌和高等生物有作用。多烯类抗菌素的继发作用是抑制糖酵解和呼吸。根据这类抗菌素改变细胞质膜通透性的特性,曾用蟾蜍的皮肤及膀胱和鸡肠等来研究膜的功能。

已知影响原核细胞的细胞质膜、改变通透性传递功能的抗细菌抗菌素有多肽抗菌素和大环内脂抗菌素,如多粘菌素、短杆菌肽、缬氨霉素等。多粘菌素类主要是通过与其细胞质膜脂类中的游离磷酸盐的交互作用(就象阳离子去污剂一样)影响细胞的表面活性,使细胞质膜中脂蛋白结构的定向作用发生障碍,不能定向地使可溶性营养物质只进不出,于是渗透膜的屏障作用就被破坏。

前面所谈到的万古霉素、瑞斯托霉素及杆菌肽等不仅作用于细胞壁,也作用于细胞质膜。另外,恩拉霉素也对细胞质膜起作用。

2. 能量代谢和抗菌素的抑制作用

真核细胞的能量代谢主要是在线粒体上进行,原核细胞的能量代谢主要是在细胞质膜和间隙体上进行,所以作用于线粒体和细菌细胞

质膜的一部分抗菌素对能量代谢也有影响,它们对氧化磷酸化的偶联产生障碍,不过有的是原发作用,有的是继发作用。

寡霉素类、放线菌素A、短杆菌肽S是研究能量代谢的良好工具。链霉素对细胞呼吸和无氧酵解也有显著影响。

六、结 语

目前已知微生物产生的抗菌素有2,500种以上,但它们的作用机制知道得不多。有些抗菌素在无细胞系统内测定的结果尚不能适用于完整的细胞内。例如,核糖核蛋白体在体内以几种不同状态存在,某些抗菌素只对一种状态的核糖核蛋白体有亲合力,而状态改变了就不被抗菌素作用。有些抗菌素有多种作用,通常不大容易区别其原发作用和继发作用。例如链霉素就很难从它对活体细胞的原发作用中分出继发效应。目前认为,链霉素对细菌的致死效应是干扰蛋白质合成的结果,但对整体细胞的一些效应尚无法解释。可见,确切肯定一种抗菌素的作用机制是相当困难的。

抗菌素作为生物化学和分子生物学研究的工具,在短短的十几年中作出的贡献是惊人的。不少治癌抗菌素尽管化学类型有别,生化作用点却比较一致,大部分是抑制核酸合成,有的通过抗菌素的发色基团和核酸形成复合体,有的破坏核酸结构;有的作用于参与核酸合成的各种类型的酶,虽然它们有共性,但又有各自的个性。正因为如此,就成了研究核酸分子生物学的良好工具,反过来又促进了抗肿瘤抗菌素分子药理学的发展。

研究抗菌素对核糖核蛋白体的作用,有利于蛋白质的生物合成机制的阐明,同时也提供了药物杀死致病细菌的原理,这点在原核细胞里尤为明显。在真核细胞里,利用抗菌素可知叶绿体及线粒体蛋白质合成和细胞质蛋白质合成的不同,是两套系统。用分子遗传学方法发现细菌的抗药性如果是染色体突变引起的,则大部分是核糖核蛋白体结构发生了改变,致使不能和抗菌素结合,使药物失去作用;如果是质

体(如R因子)引起的,则产生钝化抗菌素的各种酶,如对青霉素产生 β -内酰胺酶,对氯霉素产生乙酰化酶,对链霉素产生腺苷化酶和磷酸化酶。这个发现是有实用价值的,它告诉我们,假定药物抗性是质体决定的,那么改变药物的化学结构,不使酶钝化,抗菌素是防治抗药性菌感染的途径之一。

抗菌素作为正常代谢的结构类似物对阐明核酸的代谢途径和细胞壁合成曾起了一定的作用。抗菌素对细胞质膜功能的影响,主要是由于与真核细胞质膜中的各类固醇及原核细胞质膜的脂类中游离的磷酸盐发生作用而造成的,有些作用于原核细胞质膜的抗菌素对能量代谢也有影响。

抗菌素对生物作用的范围很广,前述之外,尚有对细胞器、形态建成及分化和离子代谢等影响。

抗菌素的选择毒性,不论在实践上还是在理论上都是非常重要的,正因为有了选择毒性,我们才能在不影响人体的生理机能的状态下杀死致病微生物;正因为有了选择毒性,我们才能利用它来研究生化过程。因此,选择毒性的研究是重要的研究课题。

我们相信,随着分子药理学和分子生物学以及新技术的发展,抗菌素的作用机理将得到进一步阐明。不难设想,有可能在此基础上研制出理想的药物,而它作为生物化学和分子生物学的工具也更能发挥其作用。

(上接第50页)

这方面,对高等生物也可能存在类似的机制。

四、激素通过 cAMP 调节遗传基因的活性

大量实验资料证明,高等动物、昆虫和植物中都有许多激素通过调节遗传基因的活性而起作用。根据“第二信使”学说及其实验事实,目前可以肯定高等动物和人体的蛋白质激素、多肽类激素以及肾上腺素(可统称为含氮激素)是通过激活腺苷酸环化酶,促进 cAMP 的生成,进而发挥上述作用的(见图)。

随着研究的进展,发现 cAMP 作为“第二信使”的含意可能比 Sutherland 最初提出的概念要更为广泛。一些实验表明,高等动物的甾类激素,以及某些植物激素,例如赤霉素、吲哚乙酸、细胞分裂素等,它们的作用也可能与 cAMP 有一定关系。昆虫激素方面,也发现心侧体提取物中的血糖上升因子(hyperglycemic factor),它的生理作用与 cAMP 有关。动物的甾类激素、昆虫激素和植物激素的作用是否也通过 cAMP 这个“第二信使”,目前还是一个争论中的问题,需要累积更多、更充分的实验证据才能作出结论。