

综述与专论

杀菌肽的研究进展及应用前景

崔晓江 刘枝俏* 田颖川 彭学贤

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 杀菌肽是在昆虫体内诱导产生的一类具有强抗菌活性的、由 30 多个氨基酸组成的多肽。它的特殊空间结构可以使原核细胞膜形成孔洞, 导致细胞死亡, 对真核细胞膜却无此作用。哺乳动物体内亦存在类似的有抗菌活性的多肽。杀菌肽因其广谱杀菌活性而引起了植物学家和医学家的注意, 已被用于植物抗病原菌和医学研究。

关键词 杀菌肽, 细胞膜, 广谱杀菌

近年来, 杀菌肽 (cecropin) 的研究和应用逐渐成为昆虫学、植物学、生理学及药理学领域的热门课题。杀菌肽是由瑞典科学家 Boman 等首先从惜古比天蚕 (*Hyatophora cecropia*) 蛹诱导分离而得, 此后许多实验室又分别从家蚕血淋巴、柞蚕蛹、麻蝇、伏蝇幼虫乃至蛙中分离出杀菌肽 S1、S2 和麻蝇素等其它具有抗菌活性的多肽或蛋白。这些多肽或蛋白具有广谱杀菌力, 是昆虫体内免疫系统的重要成分。杀菌肽的诱导分离及纯化使人们找到了一条高效抗菌的新途径, 尤其可应用于植物抗细菌及人体的抗菌感染中。

1 杀菌肽的结构和性质

由于最早的抗菌多肽是从 *H. cecropia* 中分离而来, 所以后来将所有具抗菌活性而与之有高度同源性的化合物统称为 cecropin (杀菌肽)。惜古比天蚕中还存在另一类含 184 个氨基酸的杀菌蛋白 (attacin), 而杀菌肽是由 30 多个氨基酸残基组成的小肽, 分子量为 4×10^3 左右, 等电点 (PI) 为 8.9—9.5, 100℃ 加热 10min 仍能保持一定活力, 不易被胰蛋白酶、胃蛋白酶水解。该肽链 N 端为含有色氨酸、赖氨酸和精氨酸的稳定区, C 端为含甘氨酸或脯

氨酸残基的疏水区, 中部连接部分含有脯氨酸^[1,2]。

从建立模型、理论推测及圆二色性分析均表明杀菌肽 N 端一半可以形成一个结构近于完美的极化的两亲性 (amphipathic) α 螺旋, 即圆柱形分子的纵轴一边是带正电荷的亲水集团而对称面是疏水区, C 端一半为一疏水尾^[2]。具有两亲性 α 螺旋结构的蛋白质经常与质膜相联系。根据两亲性区域的排列位置及分子内的正电荷密度, 杀菌肽至少可分为三类, 即类 Cecropin, 类 Magainin 及类 Melittin。其共同特点是都具有两亲性 α 螺旋结构, 但其位置分别处于肽链的 N 端、整个肽段和肽链的 C 端, 此二级结构可能是杀菌肽破膜活性的关键。

Jaynes 等^[2]根据计算机的模拟和分析, 在不改变其二级结构的前提下, 将杀菌肽 B 的氨基酸作了一些改变, 取代了约 60% 的氨基酸, 并将天然的杀菌肽 B 的 C 末端酰胺化的甘氨酸改为甘氨酸。结果出乎意料, 其溶菌活性远强于天然存在的杀菌肽 B, 将之命名为杀菌肽 Shiva-1 (图 1)。

* 中国医学科学院基础医学研究所。

收稿日期: 1994-01-19, 修回日期: 1994-04-07

KWKVFKKLEKMGGRNIRNGIVKAGPAIAVLGEAKALG 杀菌肽B
MPR*RL*RR*DRV*KQ*KQ*LR*****LV*D*R*V* 杀菌肽Shiva-1

图1 杀菌肽 Shiva-1 与天然杀菌肽 B 氨基酸序列比较

*表示与杀菌肽 B 相同的氨基酸; 杀菌肽 B 的 C 末端 G 为酰胺化形式.

H. cecropia 中分离出的 A、B 和 D 三种杀菌肽中, 杀菌肽 B 和 D 分别与 A 有 65% 和 62% 的同源性. 一般认为, 生物大分子活性的保持有赖于其空间结构, 而氨基酸序列决定高级结构, 所以推测如将杀菌肽 Shiva-1 作更多的氨基酸突变, 其抗菌活性可能会消失.

杀菌肽具有很宽的抗菌谱, 杀菌肽 A 和 B 对革兰氏阳性菌、特别是对革兰氏阴性菌有强大的杀伤力, 杀菌肽 D 只对大肠杆菌 (*E. coli*) 和醋酸钙不动杆菌 (*A. calcoaceticus*) 有较高溶菌活力^[1,2]. 一般来讲, 杀菌肽的杀菌活力很高, 致死浓度均在 $\mu\text{mol/L}$ 级. Nordeen 等^[3]研究了杀菌肽 SB37 对感染 7 种植物的 9 种病原菌的作用, 发现其致死浓度在 0.1—4.5 $\mu\text{mol/L}$ 之间.

检测杀菌肽抗菌效果的方法很多, 如计算菌体的减少、光吸收度下降及紫外吸收的增加等. 但常用的方法还是测量琼脂板上抑制环的大小, 从而得知其最小抑制浓度.

2 杀菌肽基因的分子生物学

cDNA 克隆的序列分析表明, 杀菌肽是由 62—64 个氨基酸残基的前体蛋白衍化而来, 经过四个步骤变成为成熟的多肽^[4]. 杀菌肽 B 是最早克隆出来的一种, Gudmundsson 等^[5]亦克隆了前体杀菌肽 A 和 D (preprocecropin A, D) 基因, 三种杀菌肽基因均位于一个全长 20kb 的 DNA 上, 而且各基因为单拷贝/单倍体基因组, 过长的 DNA 归因于每个基因之间距离很远而且 A 和 D 基因中均存在内含子. 来自果蝇的杀菌肽基因已被定位于第三条染色体的 99E 位点^[6]. 杀菌肽基因的表达有所不同, 杀菌肽 A 和 B 基因的转录在感染细菌后 2h 出现, 48h 后达峰值, 此后数天持续高表达, 杀菌肽 D 则延后至 48—96h 出现反应而

144h 后达表达高峰值. 与以上结果相对应, 感染后 10—24h 血淋巴中可检测到成熟的杀菌肽 A 和 B, 48h 后才能检测到杀菌肽 D.

3 杀菌肽的抗菌机理

对杀菌肽的结构与功能、抗菌作用机理的研究正在进行之中. 从目前研究的结果看, 杀菌肽的抗菌活性依赖于其两亲性的 α 螺旋结构, 在昆虫体内杀菌肽的生理浓度下, 这种结构使之可以在原核细胞质膜上形成巨大的时间性及电压依赖性的离子通道. 电生理实验表明, 此通道的开放持续时间为 2.5ns, 推测其通道直径为 4nm, 杀菌肽 A、B 和 D 均可形成这种通道, 而融合杀菌肽 AD (包括杀菌肽 A 的 1—11 个氨基酸及杀菌肽 D 的 12—37 个氨基酸残基) 是能更有效地形成通道的杀菌肽, 其抗菌活性亦十分强大^[7]. 所以, 杀菌肽抗菌的关键是在质膜上形成离子通道性质的孔洞, 致使细胞内外渗透压改变, 细胞内容物尤其是 K^+ 大量渗出, 细菌因此死亡.

杀菌肽插入细菌质膜的过程可能如下: 第一步, 在水相与质膜交界面上, 杀菌肽寡聚物与脂质双层膜之间通过静电吸引而靠近, 带正电荷的肽端集聚于此; 第二步, C 端疏水区插入膜中, 两亲性的 α 螺旋置留于膜界面的位置. 此步骤的关键不在于 α 螺旋结构本身, 而取决于 N 端 α 螺旋与强疏水 C 端之间的连接结构. 柔性伸展的连接易于完成此过程, 如杀菌肽 B 中含脯氨酸的中间连接部分, 若为刚性连接, 则不能完成. 第三步, 两亲性的 α 螺旋插入质膜, 由于其亲水、疏水两性存在, 在质膜上形成较大孔洞, 细胞因而不能保持正常渗透压而致死 (图 2)^[7].

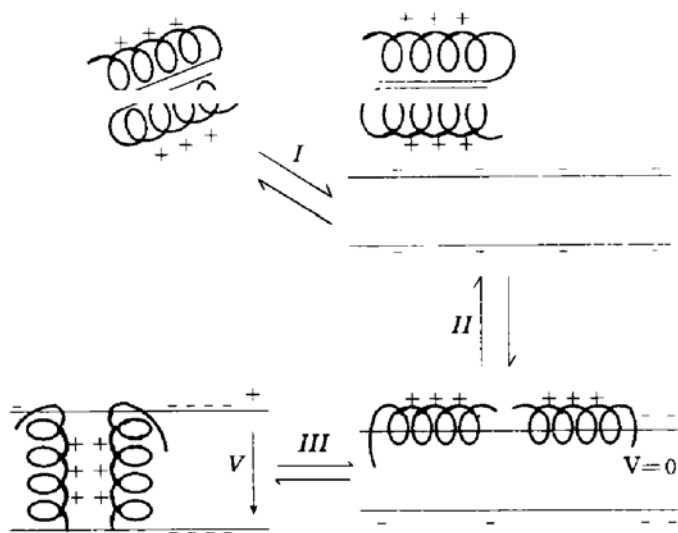


图2 杀菌肽插入脂质双层膜的模型

I: 静电吸附; II: C 疏水端插入质膜; III: 带正电 α 螺旋插入质膜, 形成通道。

值得注意的是, 杀菌肽只对原核生物细胞产生特异的溶菌活性, 对最低等的真核生物如酵母以及某些植物的原生质体也有一定的杀伤力。这种特性的原因在于原核和真核细胞结构、尤其是膜结构的不同, 真核细胞质膜具有膜蛋白和胆固醇, 尤其是后者的存在, 使细胞膜趋于稳定, 而且哺乳动物细胞中存在高度发达的细胞骨架系统, 其中的微丝、微管与质膜内层有着许多结合位点, 这种结构是细胞维持特殊形状和渗透压的首要因素, 它的存在抵抗了杀菌肽的溶菌作用。Jaynes 等^[2]用细胞松弛素 (cytochalasin) 将哺乳动物细胞中的骨架结构去除后, 此细胞对杀菌肽的溶菌作用很敏感。此现象的重要意义在于许多癌细胞内的细胞骨架系统与正常细胞相比是不发达的, 体外实验表明, 对正常细胞无害浓度的杀菌肽可以杀死许多癌细胞株。所以在人类的众多治疗癌症的方法中, 杀菌肽可以发挥一定的作用。较低浓度的杀菌肽对烧伤病人的伤口愈合也有一定的促进作用, 可能是加速了创伤处细胞的分裂增殖。此外, 杀菌肽对有包膜的病毒亦有杀伤效能, 其医用价值不言而喻。随着对杀菌肽作用机理的进一步了解, 科学家们将可能设计出用于农业和医药工业的更有效的杀菌肽。

4 杀菌肽的基因工程

Steiner 等^[8]从免疫天蚕蛹基因文库中获得含杀菌肽编码区的 DNA 片段, 与粉纹夜蛾杆状病毒多角体蛋白基因载体重组, 将重组病毒直接感染惜古比天蚕蛹, 得到高水平抑菌活性物。谢毅等^[8]以杀菌肽 B 的氨基酸序列为依据, 选用植物偏爱的遗传密码重新设计其基因, 用 DNA 合成仪合成完整的基因, 构建重组质粒, 与野生型 AcNPV 共转染 sf 细胞。

国内一些实验室已将各种来源的杀菌肽基因导入根癌农杆菌并感染烟草或桑叶叶盘以诱导成苗。我们实验室通过 PCR 技术, 扩增改造了编码植物信号肽的 DNA 片段和杀菌肽 Shiva-1 基因, 将两者融合后, 经过中间质粒过渡, 插入二元载体, 得到高等植物分泌型抗细菌表达载体 pBin438 PRSI, 同时也获得了只含杀菌肽基因的植物细胞内表达载体 p438SI。我们考虑病原细菌寄生于植物细胞间隙, 若将杀菌肽分泌至胞外, 就能在病菌侵染早期杀灭之, 我们将构建好的 p438SI、p438PRSI 载体分别转入农杆菌, 对得到的具有卡那霉素抗性的烟草植株, 用 PCR 方法进一步证明是目的基因的转化植株。目前转基因烟草的抗细菌实验正在进行之中, 初步的实验结果表明杀菌肽 Shiva-1 对青枯病菌 (*P. Solanacearum*) 有抗性作用, 有望获得抗细菌病的转基因烟草。

5 哺乳动物细胞中存在的抗菌多肽

过去一直认为只在昆虫体内存在杀菌肽, 目前在哺乳动物细胞内也发现了类似的多肽。这种动物细胞内源性杀菌多肽称作防卫素, 是嗜中性白细胞产生的一组相关的蛋白质, 具有强大的超广谱抗菌性^[9]。

防卫素含 27—34 个氨基酸残基, 非糖基化及精氨酸相对丰富, 含有特异的半胱氨酸结构, 其杀菌活力在于能依次穿过大肠杆菌的内膜和外膜, 类似于杀菌肽在质膜上形成通道。但防卫素的二级结构是形成 β 折叠, 这与杀菌肽的 α 螺旋结构有显著差别。

纯化的哺乳动物防卫素, 在体外 $\mu\text{mol/L}$ 级浓度下可杀死多种细菌、真菌及包膜病毒, 并具有细胞毒性和特异趋化性. 某些昆虫感染后, 其血淋巴可检测到类似防卫素的富含半胱氨酸的抗菌多肽, 表明防卫素及其同类多肽是自然免疫的可遗传因素.

哺乳动物小肠是一个重要的内分泌器官, 多种生理活性多肽均由此分泌. 在正常健康情况下, 小肠上段存在少量细菌, 往后逐渐增加, 到大肠部分细胞量可达 10^{11} 个/g 肠内容物, 所以肠内一定存在一种抗菌物质以调节小肠上部的细菌量及保护大肠粘膜. Lee 等^[10]从猪小肠中分离出两种抗菌多肽, 一种为抗大肠杆菌因子 (anti-Ec factor), 另一种为抗巨大芽孢杆菌因子 (anti-bm factor), 两种因子均已纯化. 结构分析表明两种多肽缺乏胱氨酸, 序列分析结果显示抗巨大芽孢杆菌因子与血管活性肠肽 (vasoactive intestinal peptide) 具有同源性, 而抗大肠杆菌因子具有 31 个残基, 与杀菌肽类似, 将之命名为杀菌肽 P1. 除以上外, 目前在牛的中性白细胞中也发现了另一种抗菌小肽 (bactenecins)^[11].

综上所述, 细菌病的防治是长期以来困扰人类的难题, 不论是植物受到细菌、真菌感染, 还是医疗中的手术、创伤和烧伤感染等都没有得到彻底解决. 具有强大抗菌活性的杀菌肽显然在以上方面的应用具有明显的优势, 除此以外, 它还具有杀伤癌细胞及促进伤口愈合的作用, 随着对杀菌肽研究的不断深入, 其应用前景十分乐观.

参 考 文 献

- 1 Boman H G, Hultmark D. *Ann Rev Microbiol*, 1987; **41**: 103
- 2 Jaynes J M. *Drug News and Perspectives*, 1990; **3**(2): 69
- 3 Nordeen R O, Sinden S L, Jaynes J M *et al*. *Plant*

Science, 1992; **82**: 101

- 4 Boman H G, Boman I A, Andreu D *et al*. *J Biol Chem*, 1989; **264** (10): 5852
- 5 Gudmundsson G H, Lidholm D A, Asling B *et al*. *J Biol Chem*, 1991; **266** (18): 11510
- 6 Tryselius Y, Samakovlis C, Kimbrell D A *et al*. *Eur J Biol*, 1992; **204**: 395
- 7 Christensen B, Fink J, Merrifield R B *et al*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; **85**: 5072
- 8 黄自然, 李文楚. *农业生化通讯*, 1993; **8**: 10
- 9 Lehrer R I, Ganz T. *Cell*, 1991; **64**: 229
- 10 Lee J Y, Boman A, Chuanxin S *et al*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; **86**: 9159
- 11 Romeo D, Skerlavaj B, Bolognesi M *et al*. *J Biol Chem*, 1988; **263**: 9573

Advances in the Research of Antibacterial Peptides and the Prospects of Their Application. Cui Xiaojang, Liu Zhiqiao, Tian Yingchuan, Peng Xuexian (*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080, China*).

Abstract Cecropins and other related peptides are induced in insects and composed of over 30 amino acids with strong antibacterial activity, which is due to formation of large pores in bacterial cell membranes by their specific secondary structure. Analogs of these peptides which do no harm to eukaryotic cell membranes in lethal concentrations for bacteria have been found in mammalian cells. Owing to their broad antibacterial activity, cecropins and other peptides have brought attention of plant pathologists and medical scientists and been applied to the research of medicine and plant antibacterial infection.

Key words cecropin, cell membrane, antibacterial activity, amphipathic