

蜜蜂毒溶血活性肽 (melittin) 的研究进展

周淑平 李 瑛

(北京市药品检验所)

蜜蜂毒(下称蜂毒)是很早以来人们就十分关注的毒性物质。在动物毒液中,它是研究得较早的。但对它的组成和作用模式的研究仅有二、三十年。就其组成成分的药理作用和治疗价值,无论在理论上还是在实践上都还很有限。蜂毒中含多种蛋白质和多肽,其多肽成分具较强的药理学和生物学活性,有抗炎镇痛等作用,临床上用于风湿、类风湿和牛皮癣等胶原性疾病的治疗,也可用于高血压及动脉粥样硬化、神经痛等的治疗,总有效率达 80%^[1]。

据报道在蜂毒中至少含有 14 个生物活性肽^[2-4]: melittin, melittin F, apamine, secapin, peptide-401, tertiapin, cardiopep, minimine, peptide-364 及两个 C-末端连结组胺的肽(promamine), 另外还含有 melittin, peptide-401 和 apamine 肽的变体。近年来,随着分离技术的发展,蜂毒中的生物活性肽逐个得到分离。1982 年, Stefan Shkenderv 等人报道^[5]从蜂毒中新分离出一个镇痛和抗炎的多肽——adolapin。它由 103 个氨基酸残基组成, SDS 凝胶电泳测得其

分子量为 11500。

必须指出蜂毒中一些含量很少的肽是不容易分离得到的。Jack Gauldie 等人使用 700 克粗毒, 仅仅能分离出 8 个肽成分。

蜂毒中的多肽, 研究较多的是溶血活性肽——melittin。就其重量和活性而论, melittin 是意大利蜂 (*Apis mellifera*) 毒液的主要成分, 占干燥蜂毒的 40—50%, 因此较其他肽易于分离得到。目前报道多为 melittin 的研究动态。本文将就溶血活性肽作一综述。

一、melittin 的结构与功能

自 1952 年由电泳分离得到 melittin 以来, 它的结构与功能研究已进行了很多工作。melittin 最初被认为是一个单一的肽, 以后又报道它至少含三种直接相关的成分, 称作 melittin I、melittin II 和 melittin F, 分别由 26, 27 和 19 个氨基酸残基组成。Habermann 测定了它们的一级结构^[6](图 1)。melittin II 自第 21 个氨基酸残基之后与 melittin I 稍有不同^[7]。它是

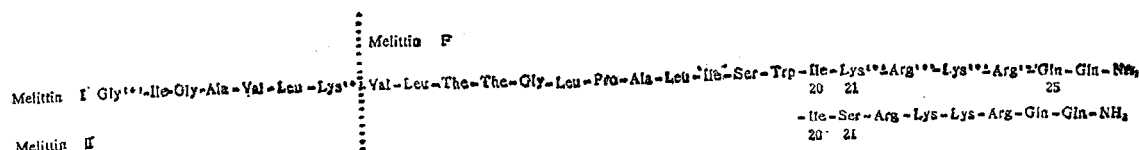


图 1 melittin 三种变体的氨基酸序列

在纯化过程中作为 melittin I 的污染物而分离出来的; melittin F 是 melittin I 的一个碎片, 从 N-末端开始, 比 melittin I 少 7 个氨基酸残基, 它可能来源于前 melittin 上的一个较小的分裂物。在毒液中, melittin II 和 melittin F 的

含量很低, 主要以 melittin I 的形式存在(下称 melittin)。

melittin 没有二硫桥, 大约 10% 的 N-末端残基被乙酰化。从 N-末端起前 20 个氨基酸残基主要是疏水的, C-末端的 6 个氨基酸残基主

要是亲水的。由于亲水残基的不均匀分布而本身体积又小,因此,这种肽不适于球状构型,在水溶液中,单体凝聚形成四聚体胶束^[8]。在通常情况下,C-末端有4个氨基酸残基携带正电荷,N-末端有2个氨基酸残基携带正电荷,整个分子带6个正电荷^[9]。从 melittin 的一级结构可见,它具有两性分子 (amphiphilic) 性质,整个分子具有强的表面活性。分子中三个赖氨酸和两个精氨酸残基的存在使 melittin 成为强碱性肽。

Takayuki Sano 等人在水饱和的正丁醇中研究了 melittin 的介电分散 (dielectric dispersion) 和圆二色性 (C,D), 揭示了它的二级结

构^[10]。在这个溶液中,melittin 呈一个个椭圆形单颗粒,定量分析长为 54Å,直径为 13Å。从椭圆率计算,melittin 分子的 N-末端的 13 个氨基酸残基以 α -螺旋构象存在。

Daniel Anderson 等人在含有硫酸铵和甲酸钠的溶液中培育了 melittin 的结晶。通过 X 射线衍射证明,在此溶液中, melittin 形成两种类型的结晶^[11],见图 2。在这个结晶中,melittin 是一个四聚体,它的 X 射线衍射模型表明,它至少含有一个 2 重旋转轴, melittin 的多肽链在 melittin 的四聚体中成对存在,两种晶型每一个不对称单位都含有二个 melittin 多肽链。

由于 melittin 的分子结构特性,使其具有

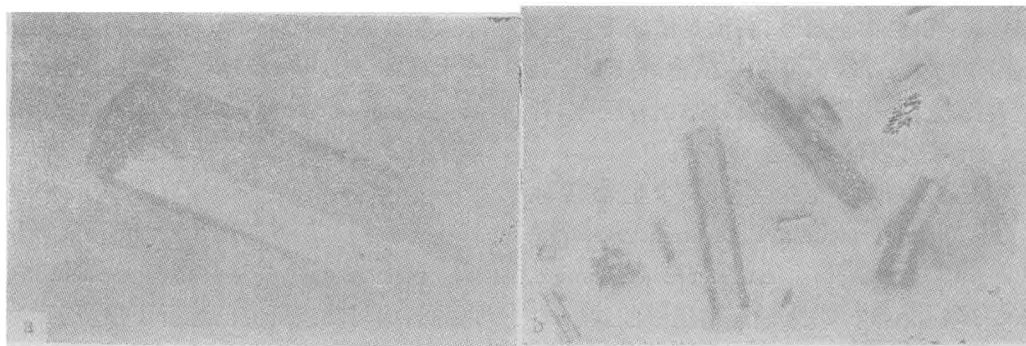


图 2 melittin 的结晶体

重要的生物学作用。它能引起红细胞溶血 (Habermann 和 Kowallek, 1970), 其溶血作用比磷脂酶 A 更强。 melittin 能从脂体中释放标记离子 (Sessa et al., 1969) 和从肥大细胞中释放组织胺 (Rothschild, 1965)。 melittin 也与磷脂酰胆碱相互作用, 形成一个相当紧密的复合物 (Mollay 和 Kreil, 1973)。 melittin 能刺激垂体——肾上腺皮质功能, 使体质激素增加, 从而产生抗炎作用。 melittin 对革兰氏阳性细菌具有抗菌作用, 1 毫克 melittin 抗菌能力相当于 0.1~93 单位青霉素^[12]。 melittin 可使受到辐射后的动物的生存率由 0.5% 增至 50.0%。 1968 年, J. Ginsberg 报道的抗 X 射线的辐射效应在统计学上是显著的。 1975 年, 苏联阿尔捷莫夫证实, melittin 不仅对 X 射线的辐射有预防作用, 而且还有治疗价值^[13]。

二、melittin 的生物合成

Kreil 等人通过给蜜蜂饲喂放射性氨基酸, 研究了 melittin 的生物合成。认为 melittin 是从 N-末端含有一个酸性序列的前体——“前 melittin” (promelittin) 上断裂下来的。“前 melittin”的氨基酸序列比 melittin 多 8 个氨基酸残基, 即 Glu-Pro-Glu-Pro-Asp-Pro-Glu-Ala-melittin (1—26)。富含酸性氨基酸和脯氨酸, 这可以导致“前 melittin”单体有更大的溶解度, 因此形成表面活性聚集体的趋向小, 从而降低了对膜的破坏能力, 仅仅当“前 melittin”从腺体的核糖体中除去之后, 才能被转变成活性毒素。“前 melittin”这个信号肽在蜂毒中尚未检测出来, 这可能是由于它进一步降解后重新被利用, 而不是随着毒液分泌出来。

表 1 来自不同蜂种的 melittin 的氨基酸残基位置

氨基酸位置 蜂 种	5	10	15	22	25	26
<i>A. mellifera</i> (意蜂)	Val	Thr	Ala	Arg	Gln	Gln
<i>A. cerana</i> (中蜂)	Val	Thr	Ala	Arg	Gln	Gln
<i>A. dorsata</i> (大蜜蜂)	Ile	Ser	Ala	Arg	Gln	Gln
<i>A. florea</i> (小蜜蜂)	Ile	Ala	Thr	Asn	Lys	Gln

melittin 具有种的特异性,从不同种的蜂毒中获得的 melittin 氨基酸残基总数相同但序列不同(见表 1)。其中,意大利蜂和中国蜂的序列是相同的,说明这两个种有密切的亲缘关系,它们可以异种交叉受精。

三、melittin 在研究生物膜上的应用及其分子机理

melittin 具有很强的表面活性,它能立即在水溶液中形成膜,并很快扩散开来。还能够透

过卵磷脂膜和混合脂膜。其通透的速度为任何表面活性剂所不及。melittin 的这一性质近年来受到生物膜研究者的重视。

David G. Bishop 等人报道^[4]: melittin 作为叶绿体光化学反应的一个抑制剂,在大约 5 μM 的浓度下, melittin 作为光合磷酸化过程中的一个解偶联剂。见表 2。在较高的浓度下 (30—50 μM), melittin 不但引起细胞色素 f 的光氧化反应,而且部分地抑制光合成电子转移的其它反应。这种抑制作用看来是由于 melittin

表 2 melittin 对光化学活性的抑制作用

		活性(微克分子 O_2 /分 mg 叶绿素)			
		对照	melittin 5 μM	melittin 30 μM	melittin 30 μM + 质体蓝素 20 μM
H_2O	MeV	1.38	7.21	0.21	4.78
DCIP/ASC	MeV	2.12	7.21	0.95	7.63
H_2O	FeCN	1.48	6.36	3.39	—
H_2O	DMQ	4.03	6.78	5.94	—

注: MeV: 联-2-N- 甲基吡啶; DCIP: 2,6-二氯酚靛酚; ASC: 抗坏血酸; FeCN: 铁氰化钾; DMQ: 2,5-二甲基-对苯醌。

的渗透引起膜脂两层的性质产生了变化。虽然 melittin 不具酶的活性,但已经证明它对膜系统具有强有力的破坏作用,这显然是由于它具有渗透到脂质双分子层的能力所致。在低浓度下,大约每 15 个叶绿体极性脂类分子与一个 melittin 分子结合,即 melittin 能迅速地穿透叶绿体极性脂类的单层,这一点已通过 ^{13}C -NMR 被证实。当 melittin 结合到叶绿体的脂质体中去时,它与脂类分子的碳氢链相互作用,使碳氢键中的碳原子的运动受到严格的限制,从而改变了脂类分子运动方向。

melittin 与生物膜相互作用的分子机理据 Magdalena T. Tosteson 等人^[5]的研究认为, melittin 在脂质双分子层中形成通道,当它暴露到卵磷脂的双分子层时,形成对阴离子比对阳离子具有更大渗透性的通道,并出现一种依赖于电压的传导性(conductance)。在固定的电压下,发现传导性随着 melittin 在水溶液中的浓度的四次幂而增加。每形成一个通道需要 4 个 melittin 分子单体,即一个 melittin 的四聚体复合物产生一个离子通道。近年来,已利用高分辨力的 ^1H -NMR 得到了解释。这个解释与 melittin 在

水溶液中自身聚合形成四聚体的结构形式是相似的。在这种形式里, melittin 的 N-末端区域形成 α -螺旋结构的空同折叠, 如通过圆二色性所看到的那样。对于亲水性的 C-末端, 可能位于聚合体的表面, 即 C-末端残基不穿过膜。由于 C-末端带有 4 个带正电荷的残基位于通道的进出口处或壁上, 所以通道对阴离子的选择超过阳离子。

Yves Maulet 等 1984 年报道^[16]: melittin 作用于各种各样的膜结构。在 $0.1 \sim 1.0 \mu\text{M}$ 的浓度下, 它渗透入脂质双分子层平面。当膜的另一侧外加一个电压时, melittin 以跨双分子层 (transbilayer) 的构象定位。melittin 作为一个四聚体, 呈现 α -螺旋结构, 所有疏水残基都位于螺旋的同一侧。在微克分子浓度下, melittin 溶解人工膜和生物膜。电子显微镜表明被 melittin 溶解的膜在没有完全破坏双分子层结构的情况下, 显示出片层结构和无定形结构。用微分扫描热量法和拉曼光谱法研究 melittin 对二棕榈酸卵磷脂, 二硬脂酸卵磷脂等各种卵磷脂的作用时, 观察到 melittin 与脂膜的结合, 四聚体比单体更有效。当四聚体处于稳定状态时, 其转变温度 T_m 下降 $10 \sim 15^\circ\text{C}$, 而 melittin 单体的 T_m 不改变^[17]。

1984 年, V. S. Gevod 等人比较^[18]了 melittin 和它的 8—26 肽碎片单分子层。在天然 melittin 和 8—26 碎片之间单分子层的表面压力 (surface pressure) (π) 和表面电势 ($\Delta\phi$) 的差别可能是由于第 7 位上的赖氨酸引起的。

melittin 和 8—26 碎片在空气-水界面上形成稳定的单分子层, 这是一个很有用的模型系统。当 melittin 引起脂膜破裂时, 它的 8—26 碎片不具有细胞溶解特性; melittin 的四聚体对 Cl^- 离子有很强的亲和力, 而 8—26 碎片对 Cl^- 离子的亲和力则十分弱。对于 Cl^- 离子的渗透, melittin 第 7 位赖氨酸的存在是必要的, 而 8—26 碎片缺少来自 N-末端第 7 位上的赖氨酸残基。melittin 和 8—26 肽碎片的表面电势限定值分别为 560mV 和 380mV 。因为在单分子层中这两个肽的定位不同于其他的球蛋白 (即偶极子沿着 α -螺旋垂直排列), 所以 $\Delta\phi$ 的量值大可能是由于这个差别引起的。此外, 这两个肽将平行定位, 其极性末端 (21—26 残基) 在水相的内侧, 而主要的非极性部分远离水相。当加入 KCl 时, melittin 单分子层表面电势 ($\Delta\phi$) 的变化显示一个更复杂的反应机理, 见图 3。最初观察到 $\Delta\phi$ 的急剧减少, 并与原始的 π 值无关。随后, 如果 π 值高, 则 $\Delta\phi$ 在达到一个稳定

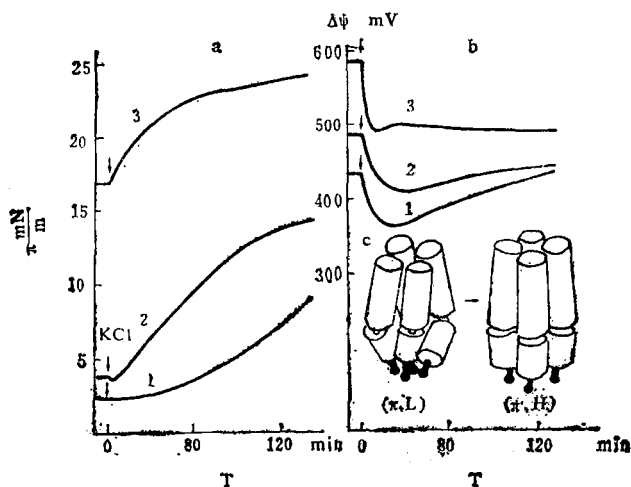


图 3 对于在亚相的 KCl 浓度由 0 变到 0.125M (通过在搅拌下加入适量的 KCl) (以箭头表示) 后, 在不同的起始 π 下的 melittin 单分子层来说, (a) π 随时间 (分钟) 的变化, (b) $\Delta\phi$ 对时间 (分钟) 的变化; (c) 图示表明在低 π (π, L) 或高 π (π, H) 时四聚体构象的变化。

状态后保持不变；如果 π 值低， $\sim 5 \text{ mN/m}$ （每米毫牛顿），则出现 $\Delta\phi$ 的最小值后又继续增加。不妨假设当四聚体存在于低 π 时，melittin 分子的两个 α -螺旋区域以一定的角度相对于四聚体的垂直轴转移。最近的研究表明：melittin 的 α -螺旋骨架具有大的偶极矩。假如由于通道内阴离子的渗透，沿着 α -螺旋的偶极电荷控制屏蔽效应（图 3c），则四聚体更加线性的构象很有可能导致 $\Delta\phi$ 的增加。

总之，melittin 单分子层的这些报道与它在脂质双分子层中的行为是一致的，即相似于在脂质双分子层中 melittin 四聚体通道的功能。最近根据由 melittin 诱导的平面脂类双分子层的电特性的变化，报道了 melittin 作用的分子机理。根据这些研究推断出由 melittin 四聚体形成电压依赖型的离子选择性通道，这些通道对阴离子（ Cl^- ）比对阳离子的渗透性强。

melittin 的结构已解析到 $2\text{\AA}$ 的分辨率。由于它易于与天然膜和人工膜的脂类相互作用，已逐渐成为考察脂类与蛋白质相互作用的通用模型系统。然而，melittin 与膜蛋白之间的直接相互作用尚未得到充分证明，这是由于大多数经提纯的膜蛋白仍含有结合脂类。另外，melittin 往往被蜂毒中的磷脂酶 A_2 所污染，形成也能作用于蛋白质的，溶血磷脂。

四、melittin 的分离纯化

melittin 作为细胞膜的研究工具，它的分离和纯化十分必要。分离纯化 melittin 报道很多。1969 年，William H. Skipman 等人^[19]在 Sephadex G50 和 Sephadex G75 柱上，用 0.1M 甲酸铵（ $\text{pH}4.5$ ）缓冲液，以 $0.013 \text{ ml/分} \cdot \text{cm}^2$ 的流速进行洗脱，得到柱层析纯的 melittin。蜂毒中大多数多肽是高度碱性，分子量又非常接近，所以分离相当不易。1973 年，G. Kreil 报道^[20]了用有机溶剂从 100 个蜜蜂腺体中能分离大约 3mg 的 melittin。1980 年，Yves Maulet 等人报道^[21]：用凝胶过滤法难于将 melittin 与磷脂酶 A_2 分开，因为在溶液中，melittin 主要以四聚体的形式存在。而四聚体的大小与磷脂酶 A_2 相似，同时它

们都具有强碱性和疏水性。Yves Maulet 等人指出，在 4.0M 脲存在下，联合使用凝胶过滤和羧甲基纤维素-52 离子交换色谱法，能够有效地防止 melittin 的聚合，从而可使二者分开。1982 年，Yves Maulet 等人又报道^[22]：采用亚硫酸分解（Sulfitolysis）和溴化氰处理，可以从 200mg 蜂毒中得到 77 mg 可适用的 melittin 制品。它的磷脂酶 A_2 的活性小于 $1 (\text{mIU/mg})$ 。

五、纯化 melittin 的分析鉴定

纯化 melittin 为米白色粉末。分子量为 2840，分子式为 $\text{C}_{131}\text{H}_{229}\text{N}_{39}\text{O}_{31}$ ，元素分析：C 55.28%，H 8.11%，N 19.19%，O 17.42%。比旋度 $[\alpha]_D^{25} - 89.52^\circ$ ($c = 0.409$)， LD_{50} 为 4 mg/kg ，克分子吸收系数 $\epsilon_{280\text{nm}}$ 为 5470 ± 190 ，HPLC 分析出现具有保留时间为 $85.3 \pm 0.6 \text{ min}$ 的单个峰，在硅胶 G 薄层上显示单一的带，其 R_f 值为 0.65 ^[23]。melittin 的氨基酸组成为：Gly₂，Thr₂，Ser₁，Glu₂，Ala₁，Pro₃，Val₂，Ile₃，Leu₄，Trp₁，Lys₃，Arg₃。其 N-末端为甘氨酸。纯化后 melittin 的氨基酸分析见表 3。

表 3 纯化后 melittin 的氨基酸分析

氨基酸	melittin	Habermann 和 Jentsch, 1967 ^[22]
Asp	0.03	0
Thr	1.90	2
Ser	0.89	1
Glu	2.09	2*
Pro	1.05	1
Gly	3.00	3
Ala	2.00	2
Val	2.08	2
Met	0	0
Ile	2.95	3
Leu	3.95	4
Tyr	0.06	0
Phe	0.07	0
Trp	n.d.	1
His	0.01	0
Lys	2.96	3
NH ₃	2.82	3**
Arg	2.04	2

* 在 melittin 中作为谷氨酰胺残基存在。

** 两个氮分子，一个来自谷氨酰胺，另一个来自末端酰胺。

铁 传 递 蛋 白

方 林 求

(安徽大学生物系, 合肥)

铁传递蛋白 (Transferrin, TF) 在维持生物体生命活动所必需的微量元素铁代谢中具有特殊作用。它存在于脊椎动物体液和细胞中; 在血液中约占 0.3%, 称为血清铁传递蛋白 (Sero-transferrin, Sero-TF); 乳、泪腺分泌液中存在乳铁传递蛋白 (Lactotransferrin, Lacto-TF); 鸟类蛋中发现有卵铁传递蛋白 (Ovotransferrin, Ovo-TF)。TF 的主要功能是作为铁的载体, 运载铁供网织红细胞进行血红蛋白的

生物合成。血液中缺乏 TF 时, 引起促红细胞生成的失调, 导致各种缺铁性贫血症发生, 同时铁在机体组织沉积以致引起中毒。测定血液中 TF 的水平对于某些肿瘤病、慢性肝炎和肝硬化、病毒和细菌性脑膜炎等都具有诊断意义^[1]。

TF 是一类蛋白质。它是由单链糖蛋白构成, 分子中有两个结合位点, 能可逆结合高铁离子和其它金属离子。研究最多的是 Sero-TF。Lacto-TF 和 Ovo-TF 的生理作用尚不完全清

综上所述, 蜜蜂毒中的溶血活性肽目前已基本分离纯化, 国外已经化学合成, Sigma Chemical Co. 有商品出售。合成品仍然保持天然 melittin 的特性。由于它具有较强的药理学和生物学活性, 因此引起了许多研究者的极大兴趣, 近年来, 尤其在生物膜的研究上进展显著。然而其作用机理和临床疗效的评价还有待于进一步实践和深化。

参 考 文 献

- [1] 冀中惠: 《蜜蜂杂志》, 4, 28, 1982。
- [2] Nelson, D. A. and O'Connor. R.: *Can. J. Biochem.*, 46: 1221, 1968.
- [3] Habermehl/Mebis (Ed.): *Proceedings on the third Symposium on Plant, Animal and Microbial Toxins*, P. 65, 1979.
- [4] Jack Gaudie, Jennifer M. Hanson et. al.: *Eur. J. Biochem.*, 61: 369, 1976.
- [5] Stefan Shkendenderov and Krasimira Koburova: *Toxicon*, 20(1): 317—1982.
- [6] Habermann, E.: *Science*, 177: 314, 1972.
- [7] Von Joachim Jentsch: *Liebigs Ann. Chem.*, 757: 193, 1972.
- [8] 冯慧主编: 《昆虫生理学研究进展》, 第三集, p. 55, 科学出版社, 1984。
- [9] Anthony T. T.: *Venoms-Chemistry and Molecu-*

- lar Biology*, P. 502, 1977.
- [10] Takayuki Sand and Gerhard Schmarz: *BBA*, 745: 189, 1983.
- [11] Daniel Anderson et. al.: *J. Biol. Chem.*, 255(6): 2578, 1980.
- [12] 王本祥: 《药学通报》, 15(5): 24, 1980.
- [13] 钱锐: 《国外畜牧学—蜜蜂》, 1, 21, 1984.
- [14] David G. Bishop and Janette R. Kenrick: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 97(3): 1082, 1980.
- [15] Magdalena T. Tosteson and Daniel C. Tosteson: *Biophys. J.*, 36(1): 109, 1981.
- [16] Yves Maulet, Urs Brodbeck et al.: *BBA*, 778(3): 594—601, 1984.
- [17] Jean-Louis, Jean-Francois et al.: *BBA*, 775(1): 37—50, 1984.
- [18] V. S. Gevod and K. S. Birdi: *Biophys. J.*, 45(6): 1082, 1984.
- [19] William H. Shipman and Leonaro J. Cole: *Anal. Biochem.*, 29: 490, 1969.
- [20] G. Kreil: *FEBS LETTERS*, 33(2): 241, 1973.
- [21] Yves Maulet, Bernard Mathey-Prevot et al.: *BBA*, 625: 274, 1980.
- [22] Yves maulet, Urs Brodbeck et al.: *Anal. Biochem.*, 127: 61, 1982.
- [23] Joachim Jentsch and Hans-Werner Mücke: *International Journal of Peptide and Protein Research*, 9(1): 78, 1977.

[本文于 1985 年 8 月 17 日收到]