

鱼类抗菌肽的研究进展

周庆军 邵健忠* 项黎新

(浙江大学生命科学院, 杭州 310012)

摘要 鱼类抗菌肽是鱼体天然免疫的重要组成部分, 其结构和组成复杂多样. 根据生化和结构特点, 可将它们分为 4 种基本类型: 具有疏水或双亲性 α 螺旋结构的抗菌肽、含多对二硫键并可形成 β 折叠结构的抗菌肽、组蛋白样抗菌肽和具有糖基化修饰的抗菌肽. 鱼类抗菌肽多以前肽原的形式合成, 通过酶解切除信号肽和羧基端酸性片段后形成有活性的成熟肽. 成熟肽具有很强的抑菌活性, 其最小抑制浓度多在毫摩尔水平. 目前, 已克隆了多个鱼类抗菌肽基因, 揭示了 pleurocidin 等基因家族的结构及其转录调控特点. 鱼类抗菌肽的抗菌机制已建立了“桶-桶板”和“地毯”样两种模型, 基本阐明了抗菌肽分子结构与抗菌功能间的关系.

关键词 鱼类抗菌肽, 分子结构, 基因克隆, 抗菌机制, 生物学活性

学科分类号 Q518

随着抗生素的普遍使用, 致病菌的抗药性问题已越来越引起人们的重视, 研究和开发新型抗菌药物已成为迫切的课题. 近年来, 在多种动物中发现的抗菌肽以其独特的抗菌机制、广谱的杀菌作用、高效的抗菌活性以及靶菌株难以产生抗性等优点而倍受关注. 迄今, 已有几十种鱼类抗菌肽被分离出来, 部分收录在意大利 Trieste 大学的抗菌肽数据库中(www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/pag1.htm). 本文将就当前鱼类抗菌肽的研究进展作一综述.

1 鱼类抗菌肽的生化特点与组成

鱼类抗菌肽是一类小分子蛋白质, 其结构与组成复杂多样. 从已报道的序列来分析, 它们并没有很高的同源性, 但存在一些共同特征, 如含有较多精氨酸或赖氨酸而使分子带正电; 含有较多疏水氨基酸, 可使分子折叠成疏水或双亲性 α 螺旋结构等. 根据其生化和结构特点, 可以将它们分为 4 种类型.

第一类不含半胱氨酸, 与细菌细胞膜相互作用时可以折叠成有利于穿膜的疏水或双亲性 α 螺旋结构. 这类分子包括来源于虹鳟血清的 salmocidin; 八目鳗小肠的 HFIAPs (hag fish intestinal antimicrobial peptides); 泥鳅整体提取的 misgurin; 杂交斑纹鲈鱼皮肤、鳃和血液肥大细胞的 piscidins 以及分离自美洲黄盖鲷和豹鲷体表粘液的 pleurocidins 和 pardaxins 等^[1~4].

第二类含多个半胱氨酸, 可以形成 β 折叠结构, 类似于其他动物中发现的 corticostatin 或 defensin, 这类分子包括来源于虹鳟的 hepcidin 和

七鳃鳗的 LCRP (lamprey corticostatin related peptide) 等. 其中 hepcidin 由 61 个氨基酸残基组成, 含 6 个半胱氨酸; LCRP 与小鼠 corticostatin R4 和兔 corticostatin R1 结构相似, 其 19 个氨基酸残基组成的成熟肽中也含有 6 个半胱氨酸, 其中 Cys1 与 Cys5、Cys2 与 Cys4、Cys3 与 Cys6 形成 3 对二硫键, 这种配对方式与哺乳动物中的 β -defensin 1、LAP (lingual antimicrobial peptide) 和 TAP (tracheal antimicrobial peptide) 等防御素分子相一致^[5].

第三类因与组蛋白高度相似而被称为组蛋白样蛋白 (histone-like proteins, HLPs), 包括从鳃、斑鳃、斑纹鲈鱼、银大麻哈鱼和鲑等的皮肤粘液、鳃、血液和肝脏组织中分离的 parasin I、HLPs 和 SAM 等, 氨基酸序列和质谱分析表明, 它们与组蛋白 H₂A、H₂B 或 H₁ 非常相似. 其中, parasin I 来源于鳃皮肤粘膜上皮细胞, 其氨基酸序列与组蛋白 H₂A 的 N 端完全一致. 最近, Cho 等阐明了 parasin I 的形成机制, 发现鳃皮肤粘液中存在一种 procathepin D 前体蛋白, 经金属蛋白酶水解后产生 cathepin D, 它可切断组蛋白 H₂A Ser19~Arg20 间的肽键, 产生 19 个氨基酸残基的 parasin I. HLPs 包括从斑鳃皮肤中分离的 3 种抗菌蛋白, 其氨基酸序列及分子结构与 H₁ 或 H₂B 非常相似; SAM (salmo antimicrobial peptide) 则是从鲑肝脏中分离的分子质量为 20.7 ku 的抗菌肽, 经鉴定为组蛋白

* 通讯联系人.

Tel: 0571-88273287, E-mail: lscshaoj@mail.hz.zj.cn

收稿日期: 2002-04-22, 接受日期: 2002-05-28

H₁^[6~8].

第四类是具有糖基化修饰的抗菌肽, 包括从鲤体表粘液中分离的 27 ku 疏水蛋白和从虹鳟、丁鲷和鳗鲡皮肤粘液中分离的 65 ku (65Tr)、49 ku (49Te) 和 45 ku (45Ee) 抗菌蛋白等^[9].

2 鱼类抗菌肽的基因结构与功能

随着研究的深入, 一些重要的鱼类抗菌肽基因正陆续被克隆. 2000 年 Cole 等^[10]用末端标记的寡聚核苷酸探针对美洲黄盖鲈皮肤 cDNA 文库进行筛选, 得到了 317 bp 的 pleurocidin cDNA 片段, 序列分析表明, 其 5' 端 26 bp 和 3' 端 84 bp 分别转录 5'-UTR 和 3'-UTR, 中间 207 bp 为开放阅读框架, 编码由信号肽、成熟肽和酸性羧基端片段组成的含 68 个氨基酸残基的前 pleurocidin 原. 随后又对精巢基因组文库进行了筛选, 得到了全长 1 601 bp 的 pleurocidin 基因及其上游启动子序列. 分析表明, pleurocidin 基因包括 4 个外显子和 3 个内含子, 其中 5' 端的第一外显子和第二外显子编码 22 个氨基酸长度的信号肽和部分成熟肽序列. 成熟肽由 25 个氨基酸残基组成, 除了第二外显子参与编码外, 主要由第三外显子和第四外显子的部分序列编码. 成熟肽中含有 4 个赖氨酸, 带正电荷, 这有助于 pleurocidin 与细菌细胞膜的结合. 成熟肽序列后连接了一个由 21 个氨基酸残基组成的酸性羧基端片段, 由第四外显子编码, 其中包括 3 个天冬氨酸、2 个谷氨酸、2 个赖氨酸和 1 个精氨酸, 带负电荷, 目前认为该片段能中和成熟肽所带的正电荷, 使细胞避免过量正电荷积累而造成的损伤, 同时也有利于其胞内运输. 对 pleurocidin 基因上游序列分析发现, 在转录起始位点上游 56 bp 和 200 bp 处存在 TATA 和 CAAT 框, 同时还发现了许多转录因子结合位点, 如 NF-IL6、干扰素 (IFN) - α 、IFN- γ 和 Oct 1 等反应元件. 通过 GenBank 分析发现, 这些元件在鱼类的其他基因, 如鲑鱼转铁蛋白基因、Mx 蛋白基因、胰岛素样生长因子基因和黄盖鲈抗冻蛋白基因的上游结构中也普遍存在.

2001 年 Douglas 等^[2]克隆了 4 个 pleurocidin 样基因 (WF1、WF2、WF3、WF4), 发现该基因家族存在一些基本特征, 如都含有 4 个外显子和 3 个内含子, 内含子的位置与各外显子的编码情况与 Cole 等的报道相似, 如 WF4 的第一和第二外显子编码信号肽和成熟肽 N 端的 12 个氨基酸残基, 第三外显子编码成熟肽中间的 10 个氨基酸残基, 第

四外显子编码成熟肽末端的 3 个氨基酸残基和酸性羧基端片段. 同时还发现, 在 pleurocidin 家族中, 信号肽和酸性羧基端片段的序列高度保守, 成熟肽的序列虽不很保守, 但都能形成双亲性 α 螺旋结构. 2002 年 Lauth 等^[3]又从鲈鱼中克隆到 moronecidins 基因, 与 pleurocidin 基因比较后发现两者的结构基本相同, 包含了相同数量的外显子和内含子, 基因上游存在相同的 TATA 框及相关转录因子结合序列. 此外, moronecidin 也是以前体形式合成, 在 79 个氨基酸残基组成的前 moronecidin 原中, 信号肽和成熟肽长度都为 22 个氨基酸, 酸性羧基端片段则有 35 个氨基酸.

值得注意的是, 近年来水生动物免疫特异性 cDNA 文库构建和表达序列标签 (ESTs) 研究已取得较大进展, 如 Nam 等^[11]构建了日本鳎等鱼类的 cDNA 文库和 ESTs 数据库, 从中鉴定了许多免疫相关基因如 Mx 蛋白基因、补体基因、干扰素调节基因等, 有关抗菌肽的鉴定正在进行中; Gross 等^[12]通过对两种白虾 ESTs 的分析发现, 在与 44 个免疫功能基因相关的 268 个 ESTs 中, 有 172 个属于抗菌肽. 由此可见, 抗菌肽在水生动物中的分布十分广泛.

3 鱼类抗菌肽的生物学活性与功能

研究表明^[13], 鱼类抗菌肽是鱼体非特异性免疫系统的重要组成部分, 当鱼体受到损伤或病原微生物侵袭时, 能迅速产生抗菌肽以预防和杀伤病原微生物的入侵, 其合成速度快, 在体内扩散迅速、灵活的特点是其他大分子蛋白质 (如抗体等) 和免疫细胞所不具备的.

目前有关鱼类抗菌肽的活性和功能研究多数在体外进行, 许多抗菌肽对鱼类特异的甚至其他动物的病原微生物都具有杀伤活性, 其最小抑制浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 多在毫摩尔水平, 如鳊的 parasin I 和泥鳅的 Misgurin 对革兰氏阳性菌 (如 *B. subtilis*; *S. aureus* 和 *P. putida* 等)、革兰氏阴性菌 (如 *E. coli*、*S. typhimurum* 和 *serratia. Sp*) 和真菌 (如 *C. albicans*; *C. neoformans* 和 *S. cerevisiae*) 的 MIC 都在 0.5~2 mmol/L 之间, 并且两者都没有溶血现象^[6]; 鲈鱼肥大细胞的 piscidins 对鱼类的几种病原菌 (如 *S. iniae*; *A. salmonicida* 和 *A. hydrophila* 等) 的 MIC 甚至低达 1.2 μ mol/L^[1]. 此外 Noga 等^[8]还发现, 虹鳟和鲈鱼的 HLPs 对某些寄生虫 (如 *Amyloodinium*

ocellatum) 也具有致死效力, 但其杀伤作用需要较高的浓度, 而且其活性主要针对滋养体时期. 体内实验方面, Jia 等^[14]发现 cecropin-melittin 重组肽和 C 端酰胺化的 pleurocidin 可以保护银大麻哈鱼抵御 *V. anguillarum* 的感染, 同时发现, 腹腔多次注射比单次注射的保护效果要好. 此外, 近年来还发现^[15], pardaxin 可作为一种神经毒剂, 引起嗜铬细胞瘤细胞中多巴胺的释放和花生四烯酸的级联反应. 由此可见, 鱼类抗菌肽除了抗菌作用外, 可能还存在其他的生物学功能.

4 鱼类抗菌肽的抗菌机制

目前, 鱼类抗菌肽的抗菌机制主要集中在对 pardaxin 及其类似物的研究. Oren 等^[4]通过圆二色谱和核磁共振分析表明, pardaxin 分子的第 7~11 位和 14~26 位氨基酸组成的片段皆为 α 螺旋结构, 12~13 位作为一个“铰合部”连接两个 α 螺旋并形成“L”形的“螺旋-转角-螺旋”结构. Pardaxin 的这种结构在有选择性 (有杀菌作用而无溶血作用) 或无选择性 (具有杀菌和溶血双重作用) 的抗菌肽中都有发现, 当去除 pardaxin C 端 11 个氨基酸残基, 破坏了第二个 α 螺旋结构后, 其溶血活性显著下降. 1995 年 Thennarasu 等^[16]根据 pardaxin N 端 16 个氨基酸序列合成了三种类似物, 其中两种可以形成 α 螺旋结构, 证实它们既具有抗菌活性, 也具有溶血性质; 另外一种类似物不能形成 α 螺旋结构, 其溶血活性显著降低, 但抗菌活性依然存在. 此外, Oren 等还设计了一系列 pardaxin 的类似物, 每一种都带有羟基化或酰胺化修饰, 二级结构分析表明, 酰胺化类似物比非酰胺化类似物的 α 螺旋含量高出 25%~80%, 其溶血活性增强, 由此表明, pardaxin 的 α 螺旋结构有助于其溶血作用, 而对抗菌活性并不是必需的. 为了进一步证实该结论, Shai 等^[17]还合成了一系列含有 D-氨基酸的 pardaxin 类似物, 结构和功能分析显示, 它们都不能形成 α 螺旋结构, 溶血活性随之消失, 却保留了较高的抗菌效果. 此外, Oren^[4]还发现增加 pardaxin N 端的正电荷可显著增强其抗菌活性, 降低溶血作用.

Pardaxin 及其类似物的杀菌机制研究表明, 其抗菌作用符合 Ehrenstein 等提出的“桶-桶板 (barrel-stave)”模型. 在这个模型中, pardaxin 通过三个步骤表现其杀菌活性: a. 通过静电作用, 快速结合到细菌外膜上, 并扰乱外膜的分子结构;

b. 通过疏水作用插入并转移到膜脂双层分子中; c. 当其含量达到一定阈值后, 聚合形成“桶”样结构, 以其外围疏水基团与膜脂肪酸链相结合, 中央形成跨膜离子通道, 破坏膜电势, 引起胞内物质泄漏, 从而杀灭细菌^[18]. 然而, 也有人对上述模型提出了疑义, 其理由是: a. pardaxin 在 mmol/L 浓度才具有抗菌活性, 而通道在 pmol/L 即可形成; b. 电镜显示有些抗菌肽即使在最小抑菌浓度时, 细菌细胞膜完全溶解而不是形成通道; c. 根据“桶-桶板”模型, 形成跨膜通道的螺旋结构至少需要 18 个氨基酸残基, 但事实上一些小于 18 个氨基酸残基的抗菌肽或其类似物也具有抗菌活性^[4]. 另外, Shai 等^[17]实验也表明, 不含有 α 螺旋结构的 pardaxin 类似物虽不能形成跨膜通道, 但仍具有杀菌活性. 这些结果提示, 抗菌肽的抗菌机理除了通道假说外, 可能还存在其他的机制.

Pouny 等^[19]通过对 dermaseptin S 及其荧光标记类似物的研究提出了一种“地毯 (carpet)”式结构模型, 该模型认为, 某些具有双亲性 α 螺旋结构的抗菌肽可以通过与双亲性磷脂分子相互作用, 扰乱膜脂分子排列, 影响细胞膜的结构和功能, 从而起到杀菌作用. 另外, Paul 等^[20]还发现酰化的 pardaxin 可以进入细胞并聚集在核仁中, 与细胞内 DNA 或 RNA 结合, 通过影响细胞功能而杀菌. 由此说明, 抗菌肽可能还存在更为复杂的抗菌机制.

5 展 望

鱼类抗菌肽的研究加深了人们对低等脊椎动物免疫防御机制的认识, 为日益严重的鱼类病害防治开辟了崭新的途径. 同时随着鱼类转基因技术的发展, 人们有可能通过转抗菌肽基因获得抗病新品种. 可以相信, 随着研究的不断深入, 鱼类抗菌肽将对世界水产渔业的可持续发展起到重要的作用.

参 考 文 献

- 1 Silphaduang U, Edward J N. Peptide antibiotics in mast cells of fish. *Nature*, 2001, **414** (6861): 268~269
- 2 Douglas S E, Gallant J W, Gong Z, *et al.* Cloning and developmental expression of a family of pleurocidin-like antimicrobial peptides from winter flounder, *Pleuronectes americanus* (Walbaum). *Dev Comp Immunol*, 2001, **25** (2): 137~147
- 3 Lauth X, Shike H, Burns J C, *et al.* Discovery and characterization of two isoforms of moronecidin, a novel antimicrobial peptide from hybrid striped bass. *J Biol Chem*, 2002, **277** (7): 5030~5039
- 4 Oren Z, Shai Y. A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin: a pore-forming peptide isolated from mosquitofish *Pardachirus marmoratus*. *Eur J Biochem*, 1996, **237**

- (1): 303~ 310
- 5 Conlon J M, Sower S A. Isolation of a peptide structurally related to mammalian corticostatins from the lamprey *Petromyzon marinus*. *Comp Biochem Physiol*, 1996, **114** (2): 133~ 137
 - 6 Park I Y, Park C B, Kim M S, *et al.* Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H₂A in the catfish, *Parasilurus asotus*. *Febs Lett*, 1998, **437** (3): 258~ 262
 - 7 Cho J H. Cathepsin D produces antimicrobial peptide parasin I from histone H₂A in the skin mucosa of fish. *FASEB J*, 2002, **16** (3): 429~ 431
 - 8 Noga E J, Fan Z, Silphaduang U. Histone-like proteins from fish are lethal to the parasitic dinoflagellate *Amyloodinium ocellatum*. *Parasitology*, 2001, **123** (Pt1): 57~ 65
 - 9 Ebran N, Julien S, Orange N, *et al.* Pore-forming properties and antibacterial activity of proteins extracted from epidermal mucus of fish. *Comp Biochem Physiol*, 1999, **122** (Part A): 181~ 189
 - 10 Cole A M, Darouiche R O, Legarda D, *et al.* Characterization of a fish antimicrobial peptide: gene expression. Subcellular localization and spectrum of activity. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, **44** (8): 2039~ 2045
 - 11 Nam B H, Yamamoto E, Hirono I, *et al.* A survey of expressed genes in the leukocytes of Japanese founder, *Paralichthys olivaceus*, infected with Hiramé rhabdovirus. *Dev Comp Immunol*, 2000, **24** (1): 13 ~ 24
 - 12 Gross P S, Bartlett T C, Browdy C L, *et al.* Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. *Dev Comp Immunol*, 2001, **25** (7): 565~ 577
 - 13 Lehrer R I, Ganz T. Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol*, 2002, **14** (1): 96~ 102
 - 14 Jia X, Patrzykat A, Devlin R H, *et al.* Antimicrobial peptides protect coho salmon from *Vibrio anguillarum* infectious. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66** (5): 1928~ 1932
 - 15 Abu R S, Bloch S E, Lelkes P I, *et al.* Characterization of pardaxin induced dopamine release from pheochromocytoma cells: role of calcium and eicosanoids. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, **288** (2): 399~ 406
 - 16 Thennarasu S, Nagaraj R. Design of 16 residue peptides possessing antimicrobial and hemolytic activities or only antimicrobial activity from an inactive peptide. *Int J Pep Prot Res*, 1995, **46** (6): 3480 ~ 3486
 - 17 Shai Y, Oren Z. Diastereoisomers of cytolytic peptides, a novel class of potent antibacterial peptides. *J Biol Chem*, 1996, **271** (13): 7305 ~ 7308
 - 18 Shai Y. Pardaxin: channel formation by a shark repellent peptide from fish. *Toxicology*, 1994, **87** (1-3): 109~ 129
 - 19 Pouny Y, Rapaport D, Mor A, *et al.* Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry*, 1992, **31** (49): 12416~ 12423
 - 20 Paul Y, Kassebaum C, Lazarovici P, *et al.* Translocation of acylated pardaxin into cells. *Febs Lett*, 1998, **440** (1-2): 131~ 134

Progress in Fish Antibacterial Peptide Research

ZHOU Qing-Jun, SHAO Jian-Zhong*, XIANG Li-Xin

(College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China)

Abstract Many fishes produce a repertoire of positively charged antibacterial peptides as part of innate immunity to bacterial invasion. Based on their biochemical and structural properties, fish antibacterial peptides can be classified into four types: amphipathic or hydrophobic α -helical peptides without cysteine; β -sheet peptides with several disulfide bonds; histone-like proteins and glycoproteins. Despite significant variations in length and composition, a common feature of fish antibacterial peptides is that they all have special structures which allow them to bind or disturb the membrane of bacteria in millimolar concentrations. Fish antibacterial peptides are predicted to be translated as prepropeptides that undergo proteolytic cleavage of amino-terminal hydrophobic signal and carboxy-terminal acidic portion to form the mature peptides. Heretofore, several fish antibacterial peptide genes have been cloned and sequencing analyses revealed that most of them were comprised of an open reading frame with four exons and three introns and the upstream region with some consensus binding sequences for transcription factors found in other fish functional genes. Recent data suggest that the details of the antibacterial pathways may vary for different peptides and are assigned to different mechanisms. Some may kill bacteria by forming transmembrane ion channels according to the 'barrel-stave' mechanism, and some by disrupting membrane according to the 'carpet-like' mechanism. In addition, alternative mechanisms, which include their binding to DNA and their interference with DNA or protein synthesis, have been proposed to explain the antibacterial action of several peptides. The study of fish antibacterial peptides may improve the understanding of peptide-mediated host defence.

Key words fish antibacterial peptides, molecular structure, gene cloning, antibacterial mechanism, biological activity

* Corresponding author. Tel: 86-571-88273287, E-mail: lscshaoj@mail.hz.zj.cn

Received: April 22, 2002 Accepted: May 28, 2002