昆虫体液免疫中抗菌肽的研究

唐向辉 屈贤铭
(中国科学院上海生物化学研究所)

一、昆虫体液免疫研究简况

近年来,随着免疫生物化学的发展,机体防御机制的研究已不限于免疫球蛋白为基础的免疫学方面,并进一步扩大到无脊椎动物的机体防御机理的研究. 在这方面,昆虫已成为广泛研究的对象.其原因有:(1)已知昆虫的个体数估计已达 10^{18} 只,存活个体数如此之大,可以推想昆虫必能有效地防止感染. (2)业已证明所有昆虫与哺乳动物有不同的免疫学基础,如淋巴细胞和免疫球蛋白等. (3)昆虫是人,畜和作物疾病的媒介,通常具有高度专一性,研究这种专一性可以追踪昆虫免疫体系的某些特征.(4)可以比较进化程度不同的哺乳动物和节肢动物的机体防御机制的异同.

对于昆虫体液免疫的研究,早在 1884 年 Metehnikoff 就发现了水蚤对酵母菌的捕食现象,但未作深入研究. 1958 年 Brrigs 阐明了大蜡螟(*Galleria mellonella*)接种细菌后,产生抗菌性的因子. 后来,Chadwick, Boman 等又相继进行这方面的研究. 特别是近年来 Boman, Natori 等对昆虫的体液免疫及其生化性质的深入研究,使这方面的工作取得了很大的进展.

二、昆虫体液中的免疫抗菌肽

至今为止,曾先后以大蜡螟[1],惜古比天蚕(*Hyalophora cecropia*)[2], 柞蚕(*Anthereae pernyi*)[3] 等的幼虫,蛹或成虫作材料,分别注射细菌,菌疫苗,某些化学物质及用超声波处理等,都能诱导昆虫体液产生一些能够杀死细菌的物质.其中有一类是由 30 多个氨基酸残基组成的多肽,具有很强的体内或体外杀菌能力,并且是广谱性的,对一些革兰氏阴性和阳性的细菌都有作用.

昆虫体液免疫是对微生物和外来异源物的刺激所引起的防卫性反应. 它的产生需要一个诱导期,产生后持续一定时间,然后自行消失. 现有实验表明:昆虫产生抗菌肽的诱导源是非专一的,注射各种诱导源一定时间后,都能在昆虫血淋巴液中检测到抗菌肽. 诱导源与昆虫体液中出现的抗菌肽毫无应答上的特异关系,反映了昆虫的防御体系有别于哺乳动物的免疫体系. 但是,实验表明:如果先给昆虫体内注射放线菌素 D 或放线菌酮,然后注射诱导物质,则不产生抗菌肽及抗菌蛋白. 当注射大肠杆菌(*E. coli*)诱导后不同时间内注射放线菌素 D,则发现在诱导后 5 小时仍能产生抗菌肽. 这一事实说明了昆虫的免疫防御需要 RNA 及蛋白质的从头合成,而且,诱导免疫的 RNA 的合成需要经历 5 小时.

三、抗菌肽的生化研究

1. 抗菌肽的分子结构

抗菌肽是昆虫免疫后产生的能杀死细菌的一类多肽. Boman[2] 等注射阴沟肠杆菌(*Bacillus cloacas*)及大肠杆菌均能诱导惜古比天蚕蛹产生抗菌肽——天蚕素(惜古比天蚕即 cecropia, 它产生的抗菌肽命名为 cecropin, 译为天蚕素). 根据酸性电泳的图谱,天蚕素共六个组分,分别为 A、B···F. 它们都具有杀菌的功能. 屈贤铭[3], Natori[4] 等分别从中国柞蚕及家蚕(*Bombyx mori*)和棕尾别麻蝇(*Sarcophaga peregrina*)等其他鳞翅目昆虫也分离到类似的抗菌肽.

这些抗菌肽一般由 35—37 个氨基酸残基, 13—14 种氨基酸组成,分子量大约 4000 道尔

顿，具有对热稳定，碱性很强的性质. 能够在体内或体外迅速杀死包括大肠杆菌，绿脓杆菌在内的多种革兰氏阴性和阳性菌，以及一些蚕的病原菌(表 1).

已经测定了几种抗菌肽的一级结构(图 1). 从它们的一级结构可以看出，组成氨基酸可分为疏水性与亲水性两类，而且亲水性的氨基酸残基在昆虫生理 pH 环境下往往都带电荷. 这些多肽分子之间的氨基酸残基变异不大，保守性很强. 以天蚕素为例，D与A的同源程度占 57%，B 与A是 68%，而D与B只有 38%. 天蚕素结构上这种高度同源性说明这三种天蚕素的基因可能是由同一个原始基因变异而来. 这种变异是否暗示着这些多肽在杀菌功能上有分工呢? 我们认为这是可能的.

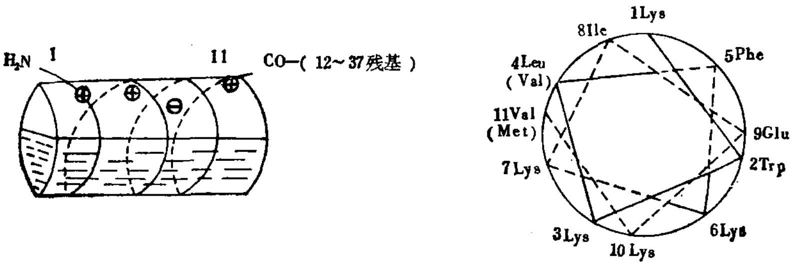
抗菌肽中 C，E 和 F 三个组分的量在体内相对说来要少一些. 分析天蚕素 C，E 和 F 一级结构发现: C的一级结构与A相同，只是前者的 C-端为游离羧基，而不是酰胺. E和F的一级结构与D相同，只是F的第17位是Asn，另外，也是E和F的 C-端为自由羧基. 这个现象的可能的解释是 C、E 和 F 分别是 A、D 的

表 1 天蚕素 A、B 和 D 以及柞蚕抗菌肽 B 和 D 的杀菌谱

微生物	种属	亲本	致死浓度 (μM)				
			天蚕素			柞蚕抗菌肽	
			B	A	D	B	D
大肠杆菌	D_{21}	D_{11}	0.32	0.19	0.43	0.36	0.37
	D_{31}	D_{21}	0.32	0.21	0.40	0.30	0.21
粘质沙雷氏杆菌	Db_{1108}	Db_{11}	2.4	2.5	12	2.6	6.1
	122		2.9	3.2	19	12.0	75.0
绿脓杆菌	OT_{97}		1.9	4.8	100	2.9	>81
X.nematophilus	Xn_{21}		1.6	1.4	19	1.6	16
巨大芽孢杆菌	Bm_{11}		0.44	0.70	41	0.64	24
枯草杆菌	Bs_{11}		18	61	>91	17	>81
苏芸金杆菌	Bt_{11}		>133	>80	>95	>88	>81
粪链球菌	AD_4		7.3	15	>95	>88	>81
	DS_{16}		>24	74	88	>88	>81
藤黄微球菌	ML_{11}		1.3	4.6	21	0.29	4

柞蚕 B: H_2N-Lys-Trp-Lys-Ile-Phe-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Val-Gly-Arg-Asn-Ile-Arg-Asn-Gly-Ile-
天蚕 B: H_2N-Lys-Trp-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Met-Gly-Arg-Asn-Ile-Arg-Asn-Gly-Ile-
天蚕 A: H_2N-Lys-Trp-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Val-Gly-Gln-Asn-Ile-Arg-Asp-Gly-Ile-
天蚕 D: H_2N-Trp-Asn-Pro-Phe-Lys-Glu-Leu-Glu-Lys-Val-Gly-Gln-Arg-Val-Arg-Asp-Ala-Val-
柞蚕 D: H_2N-Trp-Asn-Pro-Phe-Lys-Glu-Leu-Glu-Arg-Ala-Gly-Gln-Arg-Val-Arg-Asp-Ala-Val-
柞蚕 B: Ile-Lys-Ala-Gly-Pro-Ala-Ile-Ala-Val-Leu-Gly-Glu-R
天蚕 B: Val-Lys-Ala-Gly-Pro-Ala-Ile-Ala-Val-Leu-Gly-Glu-Ala-Lys-Ala-Leu-$CO\text{-}NH_2$
天蚕 A: Ile-Lys-Ala-Gly-Pro-Ala-Val-Ala-Val-Val-Gly-Gln-Ala-Thr-Gln-Ile-Ala-Lys-$CO\text{-}NH_2$
天蚕 D: Ile-Ser-Ala-Gly-Pro-Ala-Val-Ala-Thr-Val-Ala-Gln-Ala-Thr-Ala-Leu-Ala-Lys-$CO\text{-}NH_2$
柞蚕 D: Ile-Ser-Ala-Gly-Pro-Ala-Val-Ala-Thr-Val-Ala-Gln-Ala-Thr-Ala-Leu-Ala-Lys-$CO\text{-}NH_2$

图 1 不同蚕种产生的几种抗菌肽一级结构及其比较. "R" 表示尚未测定的顺序



A　　　B

图 2 天蚕素 A 和 B N-端 1—11 氨基酸残基形成的螺旋示意图[5]

A 阴影部分为疏水氨基酸残基构成的区域 **B** 氨基酸残基的走向

产物．但如果是如此的话，则不好解释 F 的第 17 位氨基酸残基的不同．

Steiner[5] 对天蚕素 A′ 和 B，以及施庆洛等[6] 对柞蚕 D 高级结构研究的结果表明，在稀的缓冲液中，天蚕素 A 和 B，柞蚕 D 是以无规卷曲状态存在，但在疏水的环境中，它们的两端则主要呈 α-螺旋状态，特别是在 N-端形成了两极性螺旋 (amphipathic helix)(图 2)．在 Pro-24 位置附近有程度不大的 β-转折结构(图 3)．

与一些碱性的抗菌蛋白或抗菌因子比较，天蚕素这类抗菌肽在氨基酸组成和分子结构上都具有自己的特点．但是，蜜蜂毒素的主要成份蜂毒蛋白 (melitin) 的分子结构却与天蚕素极为类似．蜂毒蛋白也是一个多肽(26 肽)．只是其 C-端为碱性基而 N-端为疏水基团，也具有两极性的螺旋结构．可能这两种多肽对细菌膜的作用方式是相似的．

2. 抗菌肽的人工合成

Degrado 和 Merrifield[7] 等人用不同的方法化学合成了天蚕素 A，其与天然 A 的杀菌活性比较见表 2．合成的 A-(1—37)，A-(Phe²)-(1—37)，A-(3—37)，A-(1—33) 分别为全肽，N-端第 2 位由 Phe 取代的全肽，N-端去掉两个氨基酸，C-端去掉四个氨基酸残基的肽．

Boman 等人先后分离到免疫天蚕蛹的

1 5 10 15

A H_2N-Lys-Trp-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Val-Gly-Gln-Asn-Ile-Arg-Asp-

|———$\langle P_\alpha \rangle = 1.17$———| |—$\langle P_t \rangle = 1.14$—| |———

B H_2N-Lys-Trp-Lys-Val-Phe-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Met-Gly-Arg-Asn-Ile-Arg-Asn-

|———$\langle P_\alpha \rangle = 1.19$———| |—$\langle P_t \rangle = 1.14$—| |———

20 25 30

A Gly-Ile-Ile-Lys-Ala-Gly-Pro-Ala-Val-Ala-Val-Val-Gly-Gln-Ala-Thr-Gln-

$\langle P_t \rangle = 1.11$—| |—$\langle P_\beta \rangle = 1.35$—| |—$\langle P_\alpha \rangle = 1.09$———

B Gly-Ile-Val-Lys-Ala-Gly-Pro-Ala-Ile-Ala-Val-Leu-Gly-Glu-Ala-Lys-Ala-

—$\langle P_\beta \rangle = 1.08$———| |—$\langle P_\beta \rangle = 1.17$———| |—$\langle P_\alpha \rangle = 1.14$———

A Ile-Ala-Lys-$CONH_2$

———|

B Leu-$CONH_2$

—|

图 3 天蚕素 A 和 B 的氨基酸顺序及二级结构的计算参数值

P_α，P_β 和 P_t 分别为 α-螺旋、β-片层和 β-转折

表 2 天然天蚕素 A 和化学合成的 A 生物活性比较

细菌	种属	致死浓度 (μM)				
		天然 A	合成的 A			
			-(1—37)	-[Phe²]-(1—37)	-(3—37)	-(1—33)
大肠杆菌	D21	0.32	0.32	0.34	2.6	0.43
绿脓杆菌	OT97	3.5	2.8	3.5	90	14
巨大芽孢杆菌	Bm11	0.52	0.51	0.78	13	23
藤黄微球菌	ML11	1.9	2.2	7.4	>110	27

mRNA，并且在体外翻译出具有杀菌活性的产物．后来，他们[8]又用 cDNA 的方法获得了天蚕素 B 的基因，并用克隆的方法得到了表达产物天蚕素 B．

3. 抗菌肽生物合成的部位

1980 年，Faye[2] 等从免疫的天蚕蛹中取得的脂肪体能合成大多数免疫多肽，对大肠杆菌具有良好的杀菌活性． Abu-Hakima[2] 对含有

^{3}H-尿嘧啶标记细胞的试验结果提示，血细胞及脂肪体细胞均具有生物合成的活力．但是，这些实验是在摘除获得免疫指令的脂肪体使昆虫遭受到极其严重的创伤的情况下进行的，而且脂肪体摘除是否彻底不很清楚． 更为重要的是，已知幼虫脂肪体在成蛹期逐渐被分解掉，而成虫脂肪体是另从原生细胞发育而来，与幼虫脂肪体的功能有所不同．例如，幼虫脂肪体合成70%以上的血淋巴体液蛋白，而成虫脂肪体并不合成此类蛋白．张双全等对免疫柞蚕体内抗菌肽的产生部位作了较仔细观察（待发表）．他们认为抗菌肽的产生，生殖腺体也是起作用的．但是，摘除生殖腺的柞蚕蛹血淋巴液中仍然观察到有杀菌活性，只是诱导应答的时间推迟 15 小时．

据现有的实验，抗菌肽的生物合成部位可能主要是在脂肪体，以及与其相连的生殖腺中，同时，不排除在其他细胞(如血细胞)中也有合成．也就是说，抗菌肽可能是在多部位合成的．抗菌肽六个组分是在同一部位合成，还是在不同部位分别合成？弄清这种关系，对了解昆虫的免疫机理，以及抗菌肽基因的调控是有益的．

4. 抗菌肽的杀菌机制

严格地说，抗菌肽是以何种方式杀死细菌的还不是十分清楚．根据现有实验，并参考蜂毒蛋白的作用机制，抗菌肽的杀菌机制似乎有点象补体的作用方式那样在细胞膜上穿孔．Steiner[5] 对天蚕素 A 结构分析和比较的结果指出，残基 3—7 和残基 25—28 可能参与了杀菌时的膜结合过程． 很可能 N-端的两极性螺旋首先在细胞膜上锚定（anchor）结合，然后分子的中间疏水部分穿透嵌进膜脂双层．屈贤铭等用脂质体（liposome）所作的实验证明了抗菌肽在脂膜上打孔，从而使包裹于其中的内容物泄漏出来 (leakage)．

表 1 表明，有些细菌根本不为抗菌肽所作用，而其中有些细菌（如苏芸金杆菌 *Bacillus thuringiensis*）是昆虫的致病菌．这提示昆虫致病菌能避开昆虫的防御系统．

Dalhammar[2] 从苏芸金杆菌体内分离到一种蛋白，具有酶的性质，能够专一地消化抗菌肽和抗菌蛋白 (Attacin)，可是又没有专一性的切点．看来，昆虫致病菌能够破坏其防御因子．

昆虫致病菌是否还有其他途径避开昆虫的防御系统，比如，细菌细胞膜的变化使抗菌肽等不能与之结合？这也是有可能的．解开昆虫致病菌与昆虫免疫功能关系这个迷，将有助于使昆虫益虫抗病，亦便于消灭害虫．

四、抗菌肽在昆虫防御系统中的地位

抗菌肽只是诱导源在昆虫体内诱导出的杀菌性物质之一，此外还有抗菌蛋白 (attacin) 等．同时溶菌酶和凝集素（lectin）的活力经诱导后也明显增加．它们在整个昆虫防御系统中各占有什么地位，以及它们功能有何不同，值得注意．

岩花[9]认为昆虫对细菌等外源物的防御系统大致可以分类如图 4． 概括地说，昆虫对外源侵入物的防御反应有三个阶段． 第一阶段，是皮肤和消化液的防御反应；在此阶段未被消灭的外源物就遭受第二阶段防御反应的攻击，即体液溶菌酶，血球细胞的捕食等；躲过第二阶段防御反应的外源物又受到第三阶段获得性杀菌物质(抗菌肽等)的防卫作用．

Boman[2] 提出，只是在消除高剂量的细菌感染时才需要依赖体液免疫体系的诱导作用，而消除低剂量的细菌只要血细胞的吞噬作用即可．诱导体液免疫基因启动的讯号可能来自具有吞噬作用的细胞．

Steiner 认为，由于溶菌酶只能作用为数有限的革兰氏阳性菌，因此，昆虫体液防御中溶菌酶的作用可能是消除经抗菌肽作用后的残余物．

昆虫体内的凝集素研究较多，但都没有从防御的角度去认识它． 根据凝集素的一般性质，它在昆虫防御系统中的功能可能充当识别外源物的角色．

可以认为，抗菌肽的强烈的杀菌能力和具有广谱性使它在昆虫防御系统中占有重要的地

位．在昆虫防御系统中它可能是进化程度较高的一种机制．虽然它比不上哺乳类动物的免疫体系，但毕竟拥有较强的防卫能力．

五、抗菌肽的应用研究

研究昆虫免疫机制不仅在理论上有重要意义，在生物防治，蚕病的预防等方面也有直接的指导意义．同时，由于耐药性菌株不断出现，而寻找新抗菌素又并非轻而易举，因而有些学者将注意力转移到占地球动物种类 80% 的昆虫，希望从它们身上发现新的抗菌物质．抗菌肽对一些细菌的杀灭作用，以及其组成是多肽这一

- 昆虫的机体防御反应
  - 自然抵抗
    - 皮肤的防御反应——低级脂肪酸，表皮，蜡层
    - 消化管的防御反应——消化液中的抗菌，抗病毒等物．
    - 体腔内的防御反应——
      - 体液中的液性成份
      - 血球细胞
  - 获得抵抗
    - 体液的杀菌物质
    - 体液性的细胞凝集性蛋白

图 4　昆虫对外源物的防御反应系统

特点，有可能找到它的医用价值． 对一些真菌和某些真核细胞作用的研究初步结果表明，抗菌肽在医疗卫生方面是有一定的应用价值的．张春发用柞蚕幼虫肠道致病菌接种于柞蚕体内，不仅能诱导产生抗菌肽，而且其相对产量(杀菌活性)明显高于用大肠杆菌诱导的．(待发表) 考虑到幼虫化蛹变态期间大部分昆虫肠道细菌(包括致病菌)被消除了这一现象，有助于我们深入研究在变态期间蚕肠道菌系与蚕体免疫系统的关系．同时，他们也发现抗病品种和诱导抗菌活力具有正相关关系，为寻找抗病品种提供了一个依据．

参 考 文 献

[1] Hoffmann, D. et al.: *Insect Biochem.*, **11**, 493, 1981.

[2] Boman, H. G. et al.: *Curr. Top. Microbial. Immunol.*, 94—95, pp. 75—91, 1981.

[3] 屈贤铭等: «昆虫学报» **28** (1), 1 1985.

[4] Natori, S. et al.: *Biochem. J.*, **211**, 727, 1983.

[5] Steiner, H.: *FEBS Letters*, **137**(2), 283, 1982.

[6] 施庆洛等: «第五次全国生物化学学术会议论文摘要汇编», pp. 30, 1985.

[7] Andreu, D. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6475, 1983.

[8] Boman, H. G. et al.: *Dev. Comp. Immunol.*, **9** (1), 168, 1985.

[9] 岩花秀典: «化学与生物» (日), **20**(9), 580, 1982.

[本文于 1985 年 8 月 17 日收到]

(上接第 26 页)

需，酶功能丧失并不产生 Oua^R，故可表现出 Oua^R 表型的突变类型就受限制，如缺失突变会导致酶缺陷而无法检出．

Na^+、K^+-ATP 酶的特性研究已经取得不少进展，但仍有许多问题尚未明了，尤其是在其基因结构和调控方面．这方面基础理论的突破，将会对其它方面的研究及应用起重要的推动作用．

参 考 文 献

[1] Steknoven, F. S. et al.: *Physiol. Rev.*, **61**, 1, 1981.

[2] Jorgensen, P. L.: *BBA*, **694**, 27, 1982.

[3] Baker, R. M. et al.: *Cell*, **1**, 10, 1974.

[4] Glynn, I. M. et al.: *Annu. Rev. Physiol.*, **37**, 13. 1975.

[5] Sweadner, K. J. et al.: *N. Eng. J. Med.*, **302**, 777, 1980.

[6] Mohraz, M. et al.: *J. Cell Biol.*, **98**, 1836, 1984

[7] Zampighi, G. et al.: *J. Cell Biol.*, **98**, 1851, 1984.

[8] Matsui, H. et al.: *BBA*, **151**, 655, 1968.

[9] Robbins, R. et al.: *Biochem.*, **16**, 5163, 1977.

[10] Zachowski, A. et al.: *PNAS*, **74**, 633, 1977.

[11] Charlemagne, D. et al.: *Biol. Cellulaire*, **38**, 19, 1980.

[12] Wambach, G. et al.: *Clin. Sci.*, **59**, 183, 1980.

[13] Cameron, I. L. et al.: *Cancer Res.*, **40**, 1493, 1980.

[14] Suoliuua, E. M. et al.: *Cancer Res.*, **35**, 1865, 1975.

[15] Shay, J. W. *Techniques in somatic cell genetics*, Plenum press, N. Y. p15, 1982.

[本文于 1985 年 5 月 7 日收到]