

抗菌肽对细菌杀伤作用的分子机制*

吴 希 张双全**

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省分子医学生物技术重点实验室, 南京 210097)

摘要 抗菌肽是一类新型的抗菌物质, 从最低等的生物病毒、细菌到高等的动植物都有广泛分布. 以往的研究主要集中于抗菌肽对细菌细胞膜的作用机制, 已经构建了三种作用模式. 但近几年的研究表明, 很多抗菌肽都能有效地穿过细菌的细胞膜, 直接与胞内分子相互作用, 并不引起膜的破裂. 抗菌肽根据其结构特点有着多种杀菌穿膜的机制, 其后分别与胞内的靶分子如核酸, 蛋白质, 信号转导通路等互相作用, 最终实现对细菌的杀伤作用.

关键词 抗菌肽, 杀菌穿膜机制, 生物分子

学科分类号 Q5

自从 Boman 教授在 20 世纪 70 年代中期首次从惜古比天蚕 (*Hyalophora cecropia*) 中诱导出抗菌肽以来, 由于其具有普通抗生素所不具备的一系列优点, 有关抗菌肽作用机理的研究成为了热点. 近 20 年来的研究主要着眼于抗菌肽对细菌细胞膜的作用, 已经构建出了以下几种作用模式: a. 孔洞学说 (the barrel-stave model); b. 可变毯模型 (the carpet model); c. 离子通道学说 (the aggregate channel model)^[1].

但是近年来的研究表明, 抗菌肽对细菌细胞膜的作用仅仅是第一步, 很多抗菌肽对细菌的杀伤作用都伴随着胞内的一系列反应. 本文就抗菌肽对细菌胞内的核酸、蛋白质及信号转导等方面的作用, 根据国内外最新的研究进展进行了综述, 旨在探明抗菌肽完整的抗菌机理和抗菌肽杀菌穿膜的机制.

1 抗菌肽杀菌穿膜机制

以细菌胞内分子作为作用靶点的抗菌肽都具有共同的特点: 能以相对较短的时间穿过细菌细胞膜, 直接作用于胞内的靶分子, 并不引起细胞膜的穿孔或破裂. 抗菌肽杀菌穿膜的机制主要有以下几种:

1.1 锌离子盐桥的作用

1992 年发现绵羊肺部的表面活性物质中含有三个活性小肽, 可以抑杀大肠杆菌和肺炎克氏杆菌, 它们的抗菌活性与锌密切相关. 这三个小肽富含阴离子, 需要与锌结合形成阳离子盐桥才能发挥正常功能. 盐桥能使多肽克服负电荷差, 顺利穿过

细菌外膜, 不引起任何形态上的改变. 一旦进入细胞质, 阴离子的抗菌肽可能与核糖体相连, 阻止核糖核酸酶的活性, 最终引起胞质蛋白的沉淀和析出^[2].

1.2 通过形成 Pro 铰链改变自身构型

亚洲蟾蜍的胃组织分泌的 buforin II 是由 21 个氨基酸组成的具有强大抗菌活性的多肽, 对 buforin II 的分子结构研究表明, 连接 N 端和 C 端螺旋区域的是一个脯氨酸铰链(图 1). 这种由脯氨酸造成的弯曲的螺旋有着更大的直径和更大的斜度, 使 buforin II 带有一个柔韧性的 N 端, 这种构造与其穿膜作用有很大关系^[3].

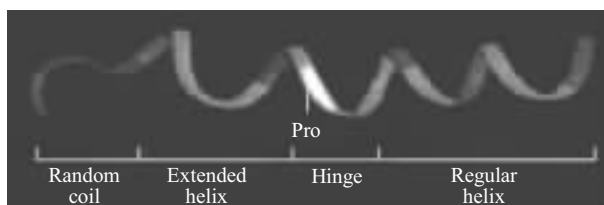


Fig. 1 Molecular structure of buforin II

图 1 Buforin II 的分子结构

中间白色部分为脯氨酸铰链.

*国家自然科学基金资助项目(30271093).

** 通讯联系人.

Tel: 025-83598720, E-mail: Zhangshuangquan@263.net

收稿日期: 2005-06-10, 接受日期: 2005-08-29

1.3 通过与膜上脂类作用

马蹄蟹的白血球分泌的 Tachyplesins 和 polyphemus I 能与细胞膜上的类脂形成肽脂超分子复合物, 使脂和肽相互耦合, 实现跨双层膜运输(转移)作用. 肽分子由膜外表面翻转到膜内侧时, 带动类脂一起翻转, 之后肽直接作用于细菌胞内的靶点, 但并不引起膜的破裂^[4]. Bac 家族可以在脂多糖 (LPS) 的辅助作用下穿过细胞膜.

1.4 通过辅助因子的共同作用

肠道细菌毒素 MicrocinB17 在辅助因子 MccB 和 MccF 的作用下快速、有效地输出细胞, 又以细胞外膜上的 OmpF 和细胞内膜上的 SbmA 为媒介, 顺利进入靶细胞, 然后迅速与细菌胞内的 DNA 旋转酶结合^[5], 作用模式图见图 2.

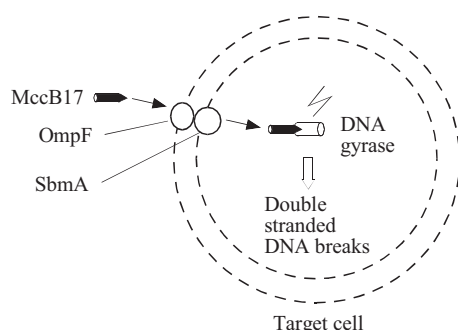


Fig. 2 MccB17 penetrates into the cell with the help of OmpF and SbmA

图 2 MccB17 在 OmpF 和 SbmA 的辅助下入膜, 与靶蛋白 DNA 旋转酶结合
图中黑色表示 MccB17.

来源于蜜蜂的抗菌肽 Apidaecin 可以作为透性酶的形式运输体系中的一员进入细胞. 具体方式为: 首先 Apidaecin 与大肠杆菌外膜成分结合, 而后, 肽进入细胞外周胞质, 与结合在细胞内膜的受体分子发生特异性结合, 进入细胞内部, 与蛋白质合成体系中的相关组分结合, 并发挥杀菌效果. 它的作用可能与终止蛋白质或 DNA 的合成, 或导致这些成分的降解有关.

1.5 通过形成膜的负压过膜

以人类唾液分泌的 Histatin5 和人类白细胞颗粒中 HNP-1 为代表的一类碱性多肽以细菌胞内的线粒体作为作用靶点, 它们穿过细胞膜的具体机制还不清楚, 但是据推测, 穿膜机制与细胞膜内部形成负的跨膜电压有密切关系.

2 抗菌肽对细菌基因转录, 表达及调控的影响

实验研究证明, 从家蝇幼虫中分离的抗菌肽 MDL-1 含有 7 个碱性氨基酸, 可通过静电引力与带负电荷的大肠杆菌染色体 DNA 骨架的磷酸基团作用, 导致 DNA 主链电荷密度降低, 结构趋于收缩, 从而构象发生变化, 产生减色效应. 但随着作用时间的延长, 抗菌肽不仅与 DNA 表面的磷酸基团作用, 而且可能部分结构嵌入 DNA 分子沟槽中, 使 DNA 收缩的构象趋于松散, 又产生增色效应^[6]. 所以, 抗菌肽 MDL-1 与 DNA 的作用表现为混合型模式, 分为嵌入和非嵌入两种方式. 随着抗菌肽 MDL-1 与 DNA 结合, 可进一步影响 DNA 的复制, 转录和表达功能, 达到迅速抑菌、杀菌的作用.

亚洲蟾蜍胃组织分泌的 buforin II 对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌都有强大的杀伤力. 将其与经典的作用于质膜的抗菌肽 magainin2 比较, 可以发现, 两者虽然结构相似, 但杀菌机理却有很大的区别. 在同样的剂量下, buforin II 能在 10 min 内穿过细胞膜, 并不引起细胞膜的溶解, 而 magainin2 过膜时在质膜上形成孔洞, 引起膜的裂解, 通常需要更长的时间. DNA/RNA binding 实验表明, buforin II 进入细胞后, 能迅速抑制 DNA 和 RNA 的移动, 它与核酸的结合力是 magainin2 的 20 倍^[7,8]. 尽管具体的作用机理还有待研究, 但是实验结果有力地证明了 buforin II 是通过与胞内 DNA/RNA 紧密结合, 抑制基因的转录和表达, 最终起到对细菌的杀伤作用.

Microcins 家族是肠道细菌分泌的一类毒素, 它对大肠杆菌敏感菌的作用导致了大肠杆菌 DNA 复制的停止, 紧接着又引发了 SOS 修复途径, 最终引起 DNA 的降解和细胞的死亡. 突变研究证明, 它们对 DNA 的作用是通过影响 DNA 旋转酶的功能来实现的. MicrocinB17 (MccB17) 是 Microcins 家族中一个 3.1 ku 的通过翻译后修饰的小肽, 它在体内和体外, 都可以诱导 DNA 旋转酶所介导的双链 DNA 解旋, 此种作用是通过酶-DNA 解螺旋复合体的阻断来实现的^[9].

其他以核酸作为作用靶点的抗菌肽总结在表 1 中.

Table 1 Action of ABP against the nucleic acids of bacterium

表 1 抗菌肽对细菌核酸的作用

来源	名称	作用核酸种类	作用结果
猪小肠嗜中性粒细胞	PR-39	DNA	阻止革兰氏阴性菌的蛋白质和 DNA 合成 ^[1]
马蹄蟹血细胞	Tachyplesin I	DNA	与 DNA 小凹槽结合, 抑制复制和转录 ^[10]
家畜乳	乳铁多钙 (Lfcin)	DNA	改变基因表达 ^[11]
兔血小板	tPMP-1	DNA, RNA	抑制核酸合成
家蚕血淋巴	CM4	DNA, RNA	与核酸结合或使其受到损伤
牛的嗜中性粒细胞	Bac家族	RNA	影响转录和能量代谢 ^[1]
牛的嗜中性粒细胞	Indolicidin	DNA	抑制 DNA 合成, 使大肠杆菌丝状化 ^[12]

3 抗菌肽对细菌胞内热休克蛋白结构与功能的影响

昆虫分泌的富含脯氨酸的多肽 Pyrrocoricin 抗菌作用靶点是细菌胞内的热休克蛋白 DnaK, DnaK 有两个主要的生理功能: ATP 酶活性和辅助蛋白质折叠. 由于在恢复部分变性蛋白的过程中, Dnak 所起的作用是必不可少的, 所以当 Pyrrocoricin 与之结合后, 使 Dnak 的活性丧失, 以 DnaK 为媒介的 ATP 酶水解活性受到抑制, 而 DnaK 的蛋白质折叠活性也受到了抑制. 研究者分别得到了 Pyrrocoricin 作用于 Dnak 的两种机制. a. Pyrrocoricin 与 Dnak 传统的底物结合部位结合, 竞争性地抑制了正常的反应底物与之结合, 所以 Pyrrocoricin 有效地减少了细胞内 Dnak 的浓度. b. Pyrrocoricin 结合到 Dnak C 端的多重螺旋 αE 和

αD 的铰链区, 通过阻止 DnaK 肽结合口袋的多螺旋盖子的开放与关闭来抑制伴侣蛋白辅助的蛋白质折叠^[13-15].

同样富含脯氨酸的多肽 drosocin 以及 apidaecin 也能特异性地结合细菌的热休克蛋白 DnaK, 使错误折叠的蛋白质不能进行修复, 引起细菌的死亡^[13].

4 抗菌肽对细菌胞内酶结构与功能的影响

猪小肠嗜中性粒细胞中富含精氨酸和赖氨酸的抗菌多肽 PR-39 对巨嗜细胞 NADPH 氧化酶活性的抑制作用, 源于 PR-39 通过 SH3 结构域与细胞质内 NADPH 氧化酶亚基 p47phox 的结合, 结合导致了此亚基不能与位于细胞膜 NADPH 氧化酶的另一组分 p22phox 相互作用, 从而阻断了 NADPH 氧化酶的组装, 影响细胞的生长, 发育和分化^[16].

可与细菌胞内酶作用的抗菌肽见表 2.

Table 2 Action of ABP against the enzymes of bacterium

表 2 抗菌肽对细菌胞内酶的作用

来源	名称	作用的酶	作用结果
肠道细菌	Microcins家族	DNA旋转酶	DNA双链解旋, 复制停止 ^[10]
肠道细菌	Microcin J25	DNA依赖性的 RNA 聚合酶	影响革兰氏阴性菌的 RNA 合成 ^[17]
猪小肠嗜中性粒细胞	PR-39	NADPH氧化酶	阻断酶的组装, 影响细胞的生长发育和分化 ^[16]
牛和猪的白血球	Cathelicidin	半胱氨酸蛋白酶	使酶不能正常工作 ^[18]
蛙类皮肤	Dermaseptin	髓过氧化物酶	刺激髓过氧化物酶的释放
人类唾液	Histatin5	蛋白水解酶	竞争性抑制酶的功能 ^[19]
牛的嗜中性粒细胞, 非洲爪蟾	Indolicidin, Magainin 2	磷脂酶 A2	调节磷脂酶的水解活性 ^[20]

5 抗菌肽对细菌胞内信号转导的影响

抗菌多肽 PR-39 对革兰氏阴性菌有很强的作用, 是哺乳动物先天免疫的一个重要组成部分. 研究表明, PR-39 与革兰氏阴性菌作用穿膜时, 并不伴随着膜的裂解, 而是迅速进入胞内, 直接与一类含 SH3 结构域的信号通路受体蛋白 P130^{cas} 分子靶点结合, 引起了此类蛋白质在胞质内定位的变化, 抑制和影响了胞内的信号传递及其网络调控, 因而, 它对生长期细菌的毒害比非生长期细菌的作用强^[21].

许多种类的抗菌肽可以影响构成细菌细胞骨架的微丝和微管的功能. 构成微管的主要成分为微管蛋白(tubulin), 近年来研究发现, 微管蛋白与跨膜信号传导过程中的关键中介体 GTP 结合蛋白(简称 G 蛋白)有着十分相似的化学特性, 也是 G 蛋白大家族中的一员. 微管蛋白通过把 GTP 分子传递给突触膜上的 G 蛋白分子将后者激活, 从而参与跨膜信号的传导过程.

6 抗菌肽对细菌胞内分子作用机制研究的展望及意义

抗菌肽的研究已有几十年的历史, 但关于抗菌肽对细菌胞内分子作用机制的研究起步较晚. 近几年来虽然取得了许多成绩, 研究者已经找到了几十种抗菌肽在胞内的作用靶点, 也在实验基础上提出了作用机理的假说, 但是大多数抗菌肽抗菌作用模式仍不是很清楚, 有待进一步地深入探索. 这必将成为今后一段时间的研究热点. 这一领域的研究将为我们更好地了解和利用抗菌肽奠定坚实的基础, 也将为把抗菌肽开发成新药, 避免抗生素滥用带来的负面影响, 提供必要的理论依据.

参 考 文 献

- Reddy K V R, Yedery R D, Aranha C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *Inter J Antimicro Agents*, 2004, **24** (6): 536~547
- Brogden K A, Ackermann M, McCray P B, *et al.* Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *Antimicrobial Agents*, 2003, **22** (4): 465~478
- Giacometti A, Cirioni O, Prete M S D, *et al.* Activity of buforin II alone and in combination with azithromycin and minocycline against *Cryptosporidium parvum* in cell culture. *J Antimicro Chem*, 2001, **47** (1): 97~99
- Hirakura Y, Kobayashi S, Matsuzaki K. Specific interactions of the antimicrobial peptide cyclic β -sheet tachyplesin I with lipopolysaccharides. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1562** (1~2): 32~36
- Pierrat O A, Maxwell A. The action of the bacterial toxin microcin B17. *J Biol Chem*, 2003, **278** (37): 35016~35023
- 宫霞, 施用晖, 乐国伟. 抗菌活性肽与细菌染色体 DNA 的相互作用机理. *自然科学进展*, 2004, **14** (5): 509~513
Gong X, Shi Y H, Le G W. *Progress in Natural Science*, 2004, **14** (5): 509~513
- Kobayashi S, Chikushi A, Tougu S, *et al.* Membrane translocation mechanism of the antimicrobial peptide buforin 2. *Biochemistry*, 2004, **43** (49): 15610~15616
- Takeshima K, Chikushi A, Lee K K, *et al.* Translocation of analogues of the antimicrobial peptides magainin and buforin across human cell membranes. *J Biol Chem*, 2003, **278** (2): 1310~1315
- Chatterji M, Unniraman S, Mahadevan S, *et al.* Effect of different classes of inhibitor on DNA gyrase from *Mycobacterium smegmatis*. *J Antimicro Chem*, 2001, **48** (4): 479~485
- Powers J P S, Hancock R E W. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, 2003, **24** (11): 1681~1691
- Ulvatne H, Samuelsen J, Haukland H H, *et al.* Lactoferricin B inhibits bacterial macromolecular synthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, **237** (2): 377~384
- Otvos L, Jr OI, Rogers M E, *et al.* Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry*, 2000, **39** (46): 14150~14159
- Gennaro R, Zanetti M, Benincasa M, *et al.* Pro-rich antimicrobial peptides from animals: structure, biological functions and mechanism of action. *Curr Pharm Des*, 2002, **8** (9): 763~778
- Chesnokova L S, Slepnev S V, Witt S N. The insect antimicrobial peptide, L-pyrrothocoricin, binds to and stimulates the ATPase activity of both wild-type and lidless DnaK. *FEBS Letters*, 2004, **565** (1~3): 65~69
- Cudic M, Condie B A, Weiner D J, *et al.* Development of novel antibacterial peptides that kill resistant isolates. *Peptides*, 2002, **23** (12): 2071~2083
- Ikeda Y, Young L H, Scalia R, *et al.* PR-39, a proline/arginine-rich antimicrobial peptide, exerts cardioprotective effects in myocardial ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Res*, 2001, **49** (1): 69~77
- Delgado M A, Salomo'n R A. Molecular characterization of a DNA fragment carrying the basic replicon of pTUC100, the natural plasmid encoding the peptide antibiotic microcin J25 system. *Plasmid*, 2005, **53** (3): 258~262
- Shinnar A E, Butler K L, Park H J. Cathelicidin family of antimicrobial peptides: proteolytic processing and protease resistance. *Bioorganic Chemistry*, 2003, **31** (6): 425~436
- Gusman H, Travis J. Salivary histatin 5 is an inhibitor of both host and bacterial enzymes implicated in periodontal disease. *Infection and Immunity*, 2001, **69** (3): 1402~1408
- Zhao H, Kinnunen P K. Modulation of the activity of secretory phospholipase A2 by antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, **47** (3): 965~971
- Linde C M, Hoffner S E, Refai E, *et al.* *In vitro* activity of PR-39, a proline arginine rich peptide, against susceptible and multi drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*, 2001, **47** (5): 575~580

Molecular Mechanisms of Antibacterial Peptides Against Bacterium*

WU Xi, ZHANG Shuang-Quan**

*(Jiangsu Province Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology,
Life Sciences College, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)*

Abstract Antibacterial peptides (ABP) are a new type of antimicrobial substance. It is widely distributed in many living organisms, from the lowest virus and germs to the higher propagation. The research foregone mostly focused on the mechanism of ABP against the cell membrane, and three modes have been put forward. Recent researches indicate that many antibacterial peptides can penetrate into the bacterial cell effectively. They act on biologic molecules inside bacterium directly without disruption of the membrane. According to different structure of antibacterial peptides, there are several mechanisms to penetrating through the membrane. By interacting with nucleic acids, proteins and signal transmissions, antibacterial peptides can finally kill and wound bacterium.

Key words antibacterial peptide(ABP), mechanism of penetrating through bacterial cell membrane, biological molecules

*This work is supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30271093).

**Corresponding author . Tel: 86-25-83598720, E-mail: Zhangshuangquan@263.net

Received: June 10, 2005 Accepted: August 29, 2005