

无脊椎动物免疫中的抗菌肽

姜玉香

(中国科学院海洋研究所)

无脊椎动物或脊椎动物对外源物质伤害的防御机理,概括地说是入侵异己物质的识别和反应。无脊椎动物不存在B或T淋巴细胞系统,在体液因子中也没有免疫球蛋白存在。因此,无脊椎动物的防御系统有别于脊椎动物。在一些无脊椎动物如昆虫、麻蝇、龙虾、蟹子、鲍鱼等体内已发现细菌或某些理化因素能诱导产生抗菌物质、溶菌酶类似物。在清除异源时,抗菌肽是绝对重要的,溶菌酶只是起清扫碎片的作用,而凝集素对外源的识别是一类重要物质。

一、抗菌肽的性质

抗菌肽(Attacins)是由细菌或某些理化因子诱导无脊椎动物而产生的一类由三十多个氨基酸残基组成的碱性多肽,具有广谱性,对革兰氏阳性、阴性细菌均具有杀死作用,且耐热性大(100℃加热30分钟仍具有活性)。一些抗菌肽的分子结构和性质已有详细报道^[3-5]。Hultmark认为抗菌肽有两类,一为碱性Attacins A—D,另一类为酸性Attacins E—F。但在抗菌肽中基本上都是碱性多肽。Natori等已测定了经刺伤体壁后的棕尾别麻蝇(*Sarcophaga pergrina*)血淋巴中提出的抗菌肽I(命名为Sarcotoxin)的一级结构。屈贤铭等也对家蚕蛹抗菌肽CM-IV组分作了一级结构测定,从已测定的抗菌肽的一级结构数据来看,它们的分子量均在4000左右,是碱性多肽,其特征是N端亲水,C端疏水。

二、抗菌肽的诱导源

超声波^[1]、大肠杆菌D31、聚肌胞核苷酸(polyI:C)^[2]、注射非特异性粒子溶液及生理盐水或体表损伤等均可诱导产生抗菌多肽。抗菌

肽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。现有实验表明无脊椎动物产生抗菌肽的诱导源是非专一性的。注射各种诱导源一定时间后,都能在血淋巴中出现抗菌肽,但在免疫应答上没有特异性。反映了无脊椎动物的防御体系有别于哺乳动物的免疫体系。

三、抗菌肽的活性测定

1. 测抑菌圈的直径法 抗菌肽的活性测定采用Bomann等的琼脂孔扩散法,在培养基上打几个直径为1.5—2.0mm的小孔,向小孔内加入2μL待测样品,在37℃下培养15—20h后,测定抑菌圈的直径,活力单位可以用抑菌圈的直径(mm)表示。

2. 抑制菌落形成法 在培养基中加入待测样品,然后接种上*E. Coli* D31,在37℃下培养15—20h,与对照比较,查形成菌落的数目。

3. 比色法 以*E. Coli* D31为底物,按Bomann等人后又经Hultmark改进的方法,测定底物的悬浊液作用前后在570nm波长处的光密度读数变化,代入下式计算:

$$U_E = \sqrt{\frac{A_0 - A}{A_0}}$$

A_0 为对照物在570nm处的光密度读数; A 为样品在570nm处的光密度读数。

四、聚丙烯酰胺凝胶电泳

将诱导后的血淋巴、1mol/L HAC及20%蔗糖各8μL,加入甲基绿在pH值为4的磷酸盐缓冲液中作垂直酸性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离抗菌肽。电泳后的凝胶放在含有0.2mol/L、pH值为4的磷酸缓冲液,100μg/mL链霉素的抗菌介质中保温一定时间后,在凝胶上铺上一

层含有 E. Coli D31 的培养基、在 37℃ 下培养十几小时, 斑点即为抗菌肽的抑菌圈。用此法可以确定免疫血淋巴中存在几种抗菌肽及其所在位置, 还可以进一步分离及测分子量。

五、抗菌肽的分离及纯化

由于抗菌肽对热稳定, 所以将收集到的经稀释后的血淋巴在沸水浴中搅拌加热 30min, 迅速在冰浴中冷却, 在 1000r. p. m. 下离心 30min, 除去变性蛋白, 上清液上层析柱分离, 洗脱液用电泳法及抑菌法进行活性鉴定。

六、抗菌肽的诱导动力学及 RNA 合成

实验表明, 放线菌酮或放线菌素 D 对抗菌肽的诱导产生具有抑制作用。预先向榨蚕蛹体内注射放线菌素 D, 然后再注射细菌, 结果无应答反应, 当注射细菌后不同时间内注射放线菌素 D, 结果发现, 5h 后即使注射放线菌素 D, 也无抑制作用, 这说明了免疫效应的诱导期为 5h。在诱导 5h 内注射放线菌素 D 能抑制抗菌肽的产生, 表明产生抗菌肽需要通过基因启动, 抗菌肽的产生是由 RNA 从头合成的。天蚕素的特异 mRNA 已初步从脂肪体中分离并在体外翻译为具有一定抑菌能力的多肽。

七、抗菌肽的抗菌机制探讨

抗菌肽的诱导动力学实验表明, 在正常情况下, 合成抗菌物质的基因是关闭的, 当无脊椎动物受到注射异物刺激后, 就能诱导基因启动并进行表达, 通过 RNA 合成抗菌物质。这些抗菌物质的产生是没有特异性的, 即与诱导源

无专一应答关系。

八、研究抗菌肽的意义

抗菌肽的活力易测, 是研究多肽结构与功能的好材料, 不仅在理论上而且在实际中也具有重要研究意义。通过了解抗菌肽抗菌机理, 可以采取与病害抗争, 有可能从免疫角度御防龙虾、虾、蟹、牡蛎等重要经济动物的细菌性、病毒性及其他寄生虫病, 并可望在医疗方面也能具有一定的应用价值。目前, 有几种抗菌肽的分子结构及氨基酸组成已研究清楚, 有希望用人工合成的方法合成抗菌肽来应用于实际工作中。

主要参考文献

- [1] 祁国荣、周奇、屈贤铭、黄自然, 1983. 超声波诱导榨蚕蛹血淋巴产生抗菌物质. 科学通报 28(10): 622—624.
- [2] 钟文彪、黄自然、卢蕴良、刘新垣, 1982. 聚肌胞核苷酸及 2', 5'-寡腺苷酸诱导家蚕对细胞质多角体病毒抑制作用的研究. 科学通报 12: 219—24.
- [3] 大森和则等, 1979. 無脊椎動物の生體防御機構, 第 3 報, 死ワテチン投与後蚕體液中に产生される抗菌物質の特性及生物活性. 日本細菌學雜誌 34(1):141.
- [4] Qu Xian-ming, Steiner, H., Engstrom, A., Bennich, H. and H. G. Bomann, 1982. Isolation and structure of cecropins B and D. Pupae of the chinese oak silk moth. *Antheraea pernyi*. *Eur. J. Biochem.* 127:219—224.
- [5] Hoffmann, D., Hultmark, D. and H. G. Bomann, 1981. *Galleria mellonella* and other Lepidoptera have cecropinlike factors active against gram-negative bacteria. *Insect Biochem.* 11(5):537—548.