

# 抗菌肽和抗菌肽基因

## ANTIBACTERIAL PEPTIDE AND ITS GENES

梁世德 张士瑾

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

动物在生存过程中,不停地同快速繁殖的病原微生物作斗争。高等哺乳动物在长期进化过程中形成了巧妙而又复杂的免疫系统,它包括参与免疫应答的各种细胞,组织和器官。对于种类繁多的无脊椎动物,其免疫系统远没有哺乳动物的复杂,它们的免疫机制还不甚清楚。近十几年的研究表明,抗菌肽在无脊椎动物的免疫系统中扮演着极为重要的角色。无脊椎动物没有B或T淋巴细胞,体液因子中也没有免疫球蛋白存在,在消灭入侵的细菌时,抗菌肽是绝对重要的,溶菌酶只是起清扫的作用<sup>[1]</sup>。

目前,在从昆虫到哺乳动物中发现了多类在起源上无关的抗菌肽,例如麻蝇和蚕等一些昆虫中的attacins<sup>[9]</sup>、两栖纲动物皮肤中防止皮肤感染的magainins<sup>[15]</sup>、中嗜中性白细胞中的bactenecins<sup>[13]</sup>等。有趣的是,从蚕等一些昆虫中发现了抗菌肽Cecropin;在猪小肠中也发现了类似物;从兔子颗粒细胞与嗜中性细胞中发现了(defensin),在两种昆虫中也发现了它的类似物<sup>[11]</sup>。现在大多数研究者认为抗菌肽是动物王国普遍存在的抵御细菌感染的一道防线。对于昆虫这些无脊椎动物来说,抗菌肽存在于血淋巴内,它可在身体的各个部分抵抗细菌的入侵,因而起着更为重要的作用。

细菌是诱导抗菌肽生成的重要原因,除此之外,还有其他一些方法可诱导抗菌肽的产生。超声波、聚肌胞核苷酸(poly I:c)、注射非特异性溶液或生理盐水或体表损伤等均可诱导产生抗菌肽<sup>[1]</sup>。有实验表明,当无脊椎动物注射异物一定时间后,血淋巴中便出现抗菌肽。无脊椎动物血淋巴中的抗菌肽在免疫应答上没有特异性,这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。

Cecropin是最早发现的抗菌肽。1980年,从注射了大肠杆菌的天蚕的血淋巴里分离到两种不同于溶菌酶的多肽性抗菌物质<sup>[7]</sup>,命名为cecropin A和cecropin B,完成了两种多肽的全部氨基酸序列测定工作<sup>[14]</sup>。又在天蚕幼虫的血淋巴里发现了cecropin D<sup>[8]</sup>。并在麻蝇、烟草角虫、柞蚕和果蝇等昆虫以及猪小肠发现了cecropin的类似物。有证据表明,至少有十几种昆虫体内存在cecropin族抗菌肽。

目前已鉴定的cecropin都是由三十多个氨基酸残基组成的碱性多肽,N端有几个严格保守的碱性氨基酸,具有亲水性,C端疏水。天蚕的cecropin A的三维结构已经搞清楚<sup>[6]</sup>,其N端前面有四个氨基酸呈松散状,接下来一个 $\alpha$ 螺旋,C端也是一个 $\alpha$ 螺旋,两个螺旋之间由一个甘氨酸-脯氨酸铰链区隔开。cecropin, magainin和defensin都能增强人工膜的离子通透性<sup>[2]</sup>,但这是否是抗菌肽的抗菌机制还有待深入研究。另一方面,抗菌肽如何增强离子通透性也是一个有趣的问题,值得进一步研究。

抗菌肽具有广谱的抗菌性能,对革兰氏阴性菌及阳性菌均具有杀灭或抑制作用。但是,不同细菌对抗菌肽的敏感性有所不同,对于敏感细菌来说,抗菌肽浓度在0.1 $\mu$ g/ml时。对细菌的生长就具有明显的抑制作用,这与抗生素的抗菌浓度相当。天蚕的cecropin A和cecropin B对大部分革兰氏阴性及阳性菌都具有明显的杀灭作用。抗菌肽能特异性地结合到细菌细胞膜上,而对血清蛋白的亲性和性较低。即使在加入10%(W/V)小牛血清情况下,抗菌肽对细菌的灭活作用仍不受影响<sup>[12]</sup>。大部分肽类抗生素在含有血清的培养基里抗菌活性则会大大下降。

天蚕,烟草角虫,果蝇和麻蝇等四种鳞翅目与双翅目昆虫的cecropin的CDNA及基因已被克隆,并测定了它们的序列,其基因结构也得到了阐明<sup>[2]</sup>。天蚕的三种cecropin基因组织在一个大的基因簇里,延伸20kb。每个基因都是单拷贝。cecropin A和cecropin D基因中都有一个长达2kb以上的内含子,cecropin B基因中内含子为514 bp。相比之下,果蝇cecropin基因中的内含子最小,只有58~61 bp(bp是碱基对的英文缩写,kb表示千个碱基对)。cecropin基因中这些内含子的大小虽然不同,但内含子的位置都是保守的。从已测定的cecropin的CDNA碱基序列可以看出,cecropin先以60多个氨基酸残基的前体形式合成后,再加工成为有活性的成熟形式。MCP1与MCP2是从兔子巨噬细胞中分离出来的两种defensin<sup>[4]</sup>,它们先以95个氨基酸残基的前体形式合成。再加工成由32-33氨基酸残基组成的活性多肽。MCP1和MCP2基因延伸13kb,每个基因里面都有两个

内含子。从这些已经测定了序列的 cecropin 与 defensin 基因看,它们都分别起源于一个共同的祖先基因。就抗菌能力而言,巨大丝蚕中的 cecropin B 的抗菌能力较 cecropin A 强,而 cecropin D 的抗菌谱较窄<sup>[2]</sup>。到目前为止还没有发现一种细菌只对一种 cecropin 敏感。有些研究者认为,抗菌肽的多态性是代表了蛋白质向不同功能进化的一个过程。抗菌肽的多态性是由抗菌肽基因的多态性决定的。抗菌肽基因的多态性可能是由于祖先基因多拷贝化后的中性漂变的结果,并无特别的意义。在果蝇中发现 cecropin 活性基因与假基因共同存在于一个基因簇<sup>[10]</sup>,这很可能是由于基因多拷贝化后有些发生失活突变的缘故。

天蚕的 cecropin A 和 cecropin B 基因的表达是平行的,但与 cecropin D 基因的表达并不平行<sup>[5]</sup>。注射大肠杆菌 2h 内,cecropin A 和 cecropin B 基因开始转录,48h 内达到高峰,血淋巴中的成熟形式在 10~24h 后可以检测到,但 cecropin D 基因的 mRNA 在 48~96h 后才能检测到。并且同 cecropin D 基因相比,cecropin A 和 cecropin B 基因结构更为相近,这也说明 cecropin A 与 cecropin B 的分化迟于 cecropin A/B 与 cecropin D 的分化。

同在陆生无脊椎动物中一样,在海洋无脊椎动物体内也发现了一些非特异性的能杀死微生物的物质。例如棘皮动物的海胆色素 A,软体动物的溶菌酶等。有资料报道,至少在七种甲壳纲动物里存在抗微生物物质<sup>[3]</sup>,其中一种抗病毒,一种抗真菌,其余几种的特点还不太清楚。到目前为止,这七种抗微生物物质还没有一种被分离纯化出来。最近,英国一些研究者发现在岸边蟹的颗粒血细胞里存在的抗菌因子<sup>[3]</sup>对许多革兰氏阴性菌及阳性菌都有灭活作用,并具有热稳定及效价很高的特点。

有关抗菌肽的研究正日益受到重视。除了继续寻找新的抗菌肽,研究它们的抗生素特性、作用机制和基因结构与调控外,目前乃至今后相当长一段时间内,热门的研究方向仍是抗菌肽基因工程。国外已经有人把人工合成的天蚕 cecropin B 类似物的基因导入烟草植株,增强了对烟草致病菌的抵抗能力。国内上海复旦大学用化学合成法设计、合成了一个以植物偏爱的遗传密码子编码的天蚕 cecropin B 基因,许多研究机构用这个基因转导经济作物,取得了一定的成果。动物抗菌肽基因工程方面,国外也有人做了一些预备性工作,取得了令人鼓舞的进展。最近研究表明,天蚕 cecropin A 前体能在其信

号肽作用下转移进入哺乳动物的微粒体。目前随着水号养殖业的发展,一些经济甲壳动物和软体动物的养殖规模迅速扩大,但养殖中的病害也日益突出。抗菌肽的模现,为我们采用基因工程技术改良某些养殖海产品提现了新思路。

## 参考文献

- [1] 姜玉香,1988. 海洋科学 6:67~68.
- [2] Boman, H. G., Faye, I., Gudmundsson, G. H., Lee, J. Y., & Lidholm, D. A., 1991. *Eur. J. Biochem* 201: 23-31.
- [3] Chisholm, J. R. S., & Smith, V. J., 1992. *JMBA* 72: 529-542.
- [4] Ganz, G., Rayner, J. R., Valore, E. V., Tumolo, A., Talmagde, K., & Fuller, F., 1989. *J. Immunol* 143: 1358-1365.
- [5] Gudmundsson, H. G., Lidholm, D. A., Åshing, B., Gan, R., & Boman H. G., 1990. *J. Biol Chem* 266: 11510-11517.
- [6] Holak, T. A., Engström, Å., Kranlis, P. J., Lindeberg G., Bennich, H., Jones, T. A., Gronenborn, A. M., & Clore, G. M., 1988. *Biochemistry* 27: 7620-7629.
- [7] Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T., Boman, H. G., 1980. *Eur J. Biochem* 106: 7-16.
- [8] Hultmark, D., Engström, A., Bennich, H., Kapur, R. & Boman, H. G., 1982. *Eur. J. Biochem.* 127: 207-217
- [9] Hultmark, D., Engström, A., Andersson, K., Steiner H. Bennich, H., & Boman, H. G., 1983. *EMBO J.* 2: 517-576.
- [10] Kylsten, P., Samakovlis C., & Hultmark, D, 1990. *EMBO J.* 9: 217-224.
- [11] Lee, J. Y., Boman, A., Chuanxin, X., Andersson M., Jornvall, H., Mutt, V., & Boman, H., 1989. *Proc Natl. Acad Sci USA* 86: 9159-9162.
- [12] OKADA, M. & NATORI, S., 1983. *J. Biochem* 211: 727-734.
- [13] Romeo, D., Skerlavai, B., Bolognesi, M., & Gennaro R., 1988. *J. Biol. Chem.* 263: 9573-9575.
- [14] Steiner, H., Hultmark, D., Engström, Å., Bennich, H. & Boman, H. G., 1981. *Nature* 292: 246-248.
- [15] Zasloff, M., 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5449-5454.