

· 综 述 ·

抗菌肽的研究进展

杨细媚¹综述, 万祥辉²△审校

(1. 江西省儿童医院检验科, 南昌 330006; 2. 江西省肿瘤医院检验科, 南昌 330029)

关键词: 抗菌肽; 耐药性; 基因工程

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.20.048

中图分类号: R978.1; Q78**文献标识码:** A**文章编号:** 1671-8348(2010)20-2803-03

目前, 由于抗菌素的大量使用, 耐药菌株和多重耐药菌株不断增加, 使抗感染治疗成为一个棘手的难题。抗菌肽(antibacterial peptides)正是在这种形势下出现的一类具有发展潜力的新型抗菌药物。抗菌肽广泛存在于昆虫、植物、动物及人体内, 是宿主产生的一类抵抗病原体感染的小分子多肽, 生物天然免疫系统中的一个重要组成部分, 具有相对分子量较小、热稳定、水溶性好等优点。由于抗菌肽分子的两亲性结构和正电荷可使其在细菌细胞质膜上穿孔而形成离子孔道, 造成细菌细胞质膜结构破坏, 引起胞内水溶性物质大量渗出, 而最终导致细菌死亡。这种独特的抗菌机制不会使病原微生物菌株变异而产生抗药性, 而且对机体无不良反应, 这将为解决细菌对传统抗菌药物日益增强的耐药性这一棘手难题提供新途径。抗菌肽除具有非特异性抗细菌、真菌、病毒和寄生虫等作用外^[1-2], 还具有抗肿瘤作用^[3], 有广阔的应用前景, 是目前国际生命科学中的活跃领域之一。

1 天然抗菌肽

天然抗菌肽指的是宿主经诱导产生的具有抗菌活性的一类小分子多肽, 来源广泛, 其分子量小, 大约在 3~6 kD 之间, 耐热、耐酸性强, 水溶性好, 显示出高效的杀菌能力和广谱的抗菌活性。近几年来, 许多学者对不少动物、植物、微生物等进行了抗菌肽的提取和分离。Ma 等^[4]从鸭子的胰脏中分离到一种新的禽类 β 防御素, 其基因组长度为 195 个核苷酸, 包含一个编码 64 个氨基酸的开放阅读框。与其他的禽类 β 防御素通过同源性分析比较, 确定其为鸭子的 β 防御素。对 21 d 龄鸭子的 17 种组织的 mRNA 水平进行分析, 发现表达量最高的为气管、心脏、胰脏、骨髓等处, 次之为胃、小肠、肾、脾等处, 而最少的位于皮肤。

Howell 等^[5]从人结肠上皮细胞分离纯化得到 4 个抗菌肽。方法是剥取人结肠上皮黏膜, 然后超声波细胞破碎仪破碎细胞, 将粗提物进行两步离子交换层析来纯化, 收集检测生物活性。Celikowsra 等^[6]从蛾血淋巴中分离出 8 种抗菌肽, 对其进行纯化后做活性检测, 发现其对革兰阳性、阴性菌及真菌都有抑菌作用。

2 基因工程获得的抗菌肽

虽然天然抗菌肽来源广泛, 但是生物体内的含量均很低, 提取、分离、纯化的技术难度大, 所需的成本高, 不利于产业化生产。随着基因工程的发展, 表达系统和纯化方法的进步, 使其大规模生产的优势越来越明显, 应用也越来越广泛。

2.1 基于原核表达系统诱导表达的抗菌肽 大肠杆菌的原核表达系统是迄今在基因工程领域中应用最多、最完善的系统。在 20 世纪 80 年代中期, 大肠杆菌表达系统被引入到抗菌肽基

因工程, 但由于抗菌肽本身对宿主细胞的不良反应和容易降解等原因使大肠杆菌作为工程菌的原核表达不易表达或者表达量很低。但科技人员还是找到了一些有效方法来解决这些问题。Bi 等^[7]利用乳铁蛋白 B 的 1~15 号氨基酸和蜂毒素的 5~12 号氨基酸设计合成了一条杂合肽。根据其在大肠杆菌密码子的偏爱性合成了其基因序列, 然后将其插入到 PET32a 中获得重组表达载体。将克隆正确的表达载体转入大肠杆菌表达菌 BL21(DE3) 中, 在最适条件下用 IPTG 进行诱导表达, 成功获得了以可融形式表达的重组融合蛋白, 其表达量超过菌体总蛋白的 35%。融合蛋白经亲和和层析后可得到 35 mg/L 菌液, 将融合蛋白用肠激酶进行裂解, 得到杂合肽。经抑菌实验证实此杂合肽具有抑菌活性。

2008 年 Chen 等^[8]选择山羊的乳铁蛋白(GLfcin)衍生的 GLfcin-L(从 20 号的丙氨酸到 60 号的丝氨酸)和 GLfcin-S(从 36 号的丝氨酸到 60 号的丝氨酸)两种抗菌肽分别构建于质粒 PET23a 载体中, 转入大肠杆菌表达菌 AD494(DE3)pLysS 中, 经 IPTG 诱导后获得包涵体形式的重组融合蛋白。亲和层析后得到的重组蛋白经抑菌实验发现 GLfcin-L 对标准菌株大肠杆菌 BCRC11549、金黄色葡萄球菌 BCRC 25923 和短小棒状杆菌 BCRC10723 有抑菌作用, 而 GLfcin-S 仅抑制大肠杆菌 BCRC11549 和短小棒状杆菌 BCRC10723, 对金黄色葡萄球菌 BCRC25923 无抑菌作用。但这 2 种抗菌肽均表现出热稳定性, 在 100 °C 可以暴露 30 min 以上。2004 年第三军医大学的 Rao 等^[9]用铜绿假单胞菌噬菌体 PaP3.30 作为一种载体分子, 对防御素等 6 种抗菌肽在大肠杆菌中进行了表达, 并取其中的 hPAB- β 为例进行了后继研究, 发现其表达量均大于总蛋白的 34%。2009 年本课题组成员利用生物信息学知识对天蚕素 A 结构进行分析, 选取了天蚕素 A 单独的 2 个螺旋区域和 2 个螺旋区域组合形成的 3 条多肽进行研究。将这 3 条多肽的基因序列分别进行串连, 然后插入到 PET31b 载体中, 以 KSI 为融合蛋白进行了串连融合表达。融合蛋白经亲和和层析获得纯化蛋白, 经 CNBr 切割获得了各多肽的单体, 经抑菌实验证实各多肽均对大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有抑菌作用。通过对天蚕素 A 的序列分析, 对 2 个 α 螺旋区分别表达和联合表达, 结果是含 2 个 α 螺旋的 CA210 抑菌活性最强, 而 N 端 α 螺旋的 CA19 比 C 端 α 螺旋的 CA36 抑菌活性强, 可见抗菌肽的抑菌活性不只是与 α 螺旋的个数有关, 还和其他因素, 如电荷数和疏水性等有关, 这为改造已有抗菌肽和设计新型抗菌肽分子提供了新思路^[10]。此外, 本课题组成员还用乳酸杆菌作为工程菌对 Bac7 进行了可溶性表达, 并证明其具有抗菌活性。

△ 通讯作者, 电话: 15879006609; E-mail: xianghuiwang@hotmail.com。

2.2 基于真核表达系统诱导表达的抗菌肽 巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 因其能高效表达重组蛋白, 且表达产物可分泌至胞外、背景蛋白少, 易于纯化等优点, 所以在蛋白表达这一块也得到广泛的应用。2005 年 Jin 等^[11] 将抗菌肽 cecropin 基因克隆入表达质粒 pPICZa-A 中, 甲醇诱导表达, 用离子交换层析分离出重组蛋白, 从 100 mL 培养液中可分离出 1.2 mg 纯的有抑菌活性的抗菌肽。其表达的抗菌肽对革兰阳性、阴性菌和真菌均有抑菌作用。2009 年 Chen 等^[12] 亦将山羊的乳铁蛋白 GLFcin and GLFcin II 分别重组含有 (His)₆-Tag 和未含 (His)₆-Tag 的 4 种抗菌肽定向克隆到毕赤酵母表达载体 pPICZαC 上, 然后转化毕赤酵母 SMD1168H, 经甲醇诱导, 这 4 种抗菌肽均得到分泌和表达。用 CM-Sepharose (不含 His-tg), HisTrap (含有 His-tg) 和 Sephadex G-25 chromatographies 分离纯化, 定量检测 100 mL 培养液中可分离出 15 mg 纯的重组蛋白。这 4 种重组蛋白具有良好的热稳定性, 并对标准菌株大肠杆菌 BCRC11549, 铜绿假单胞菌 BCRC12450, 蜡样芽孢杆菌 BCRC10603, 金黄色葡萄球菌 BCRC25923 和疮疱丙酸杆菌 BCRC10723 均有较强的抑菌效果。最小抑菌浓度从 4.07~16.00 mg/mL 不等。Wang 等^[13] 利用同源重组构建表达人类 α 防御素-5 的 pPIC9K-mHD(5) 载体, 转化到酵母 GS115 中进行表达。结果 165 mg/L 的重组蛋白得到表达, 有 50% 的重组蛋白经纯化后恢复了活性, 其除具有抗菌活性外, 还能阻断人乳头瘤病毒的感染。

杆状病毒表达系统是目前应用最广的昆虫细胞表达系统。Liu 等^[14] 将人类 β 防御素-2 插入杆状病毒表达系统中, 结果获得的重组蛋白低浓度下有很高的抑菌活性。赵昆等^[15] 根据 GenBank 中公布的牛抗菌肽 Bac7、Bac5 和 βdefense (LAP 基因) 成熟肽基因序列, 人工合成了抗菌肽融合基因 Bac7-Bac5-βdefense。克隆到 BAC-TO-BAC™ 重组杆状病毒表达系统的 pFAST HTb 载体中, 构建了重组转座载体 pFASTBac. Bac7-Bac5-βdefense, 转化 DH10Bac 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 感受态细胞, 获得重组杆状病毒穿梭载体 Bacmid-Bac7-Bac5-βdefense, 转染昆虫草地夜蛾 (*Bombyx mandarina*) St9 细胞, 收集含有重组病毒颗粒的培养上清液, 重新感染草地夜蛾 SD 单层细胞, 获得表达的融合蛋白, 表达量约占细胞总蛋白的 10.6%。体外抑菌实验表明重组的 Bac7-Bac5-βdefense 蛋白对大肠杆菌具有抑菌活性。

由哺乳动物细胞翻译后再加工修饰产生的外源蛋白质, 在活性方面远胜于原核表达系统及酵母、昆虫细胞等真核表达系统, 更接近于天然蛋白质。Fan 等^[16] 将青蛙皮肤抗菌肽 Magainin2 与一载体蛋白构建成一融合蛋白, 这种融合蛋白可以被筛选出来转入动物表达系统中。他们将融合蛋白转入中国仓鼠卵巢细胞, 结果发现这种转基因鼠表达的融合蛋白量达到 10 g/L, 这数量接近于山羊奶中 β 酪蛋白的含量。经实验证明切割后的融合蛋白有抑菌活性。这些结果显示采用融合蛋白的方式可以在动物表达系统中得到目的蛋白的高效表达, 也显示出采用转基因动物生物反应器可以作为规模化生产的一种可行方法。袁红艳等^[17] 以正常人外周血中性粒细胞的总 RNA 为模板, 用 RT-PCR 技术钓取 hCAP-18 编码序列的全长 cDNA, 并克隆至 pcDNA4/Myc. His 真核表达载体上, 转染真核细胞株 HeLa。RT-PCR 及 Western blot 方法检测到目的基因和蛋白的表达。文阳安等^[18] 采用拼接 PCR 法合成抗菌肽 PR39 基因, 克隆到真核表达载体 pIRES2-GFP 中, 经鉴定后用阳离子脂质体转染小鼠巨噬细胞 RAW264.7, 通过 RT-

PCR 和免疫荧光法检测目的基因的表达, 并对其抗菌活性进行初步检测。表达抗菌肽 PR39 的巨噬细胞杀灭和清除胞内菌的能力明显增强。

3 化学合成的抗菌肽

经化学合成的抗菌肽所需时间短, 工作量较小, 而且可以依据人们所需随意组合来提高其抗菌活性和抗菌谱。Rozgonyi 等^[19] 选择合成的一种含脯氨酸丰富的抗菌肽 A3-APO 为研究对象, 这种抗菌肽对细菌的细胞膜和细胞核均有相互作用。A3-APO 很有希望成为一种临床前期研究药物, 它的主要优点是: 一方面它可以裂解细菌的细胞膜; 另一方面它可以单独与其他小分子抗菌药物协同作用来抑制热休克蛋白 70; 此外, 它对真核细胞无不良反应, 在人体体液中可以抵抗蛋白酶的水解作用。Okuyama 等^[20] 人工合成一条抗菌肽 KLK LLL LLLK LK-NH₂(L5), 检测其和它的对应体, 发现他们均可以激活中性粒细胞产生超氧离子, 并且可以预防因耐甲氧苯青霉素金黄色葡萄球菌感染而导致死亡的小鼠。因此, 这种抗菌肽能够通过激活中性粒细胞来介导炎症反应, 发挥其抑菌作用。Cho 等^[21] 合成一种新的抗菌肽, 用树脂固定一个 β 折叠于抗菌肽的尾部。这种抗菌肽类似阳离子抗菌肽, 但是有其独特的优点, 例如: 有效的抗菌活性而无溶血性; 与万古霉素的有效协同作用; 与不含 β 折叠的其他抗菌肽相对有着更强的对类脂膜的干扰作用。由此可显示, 这种类型的抗菌肽有着很大的发展前景。

4 发展前景与存在问题

在抗菌药物耐药性十分严峻的今天, 抗菌肽作为抗菌药物的替代药物, 其发展潜力是巨大的。但因抗菌肽的分子量小、稳定性差等使其提取、加工工艺复杂, 化学合成因其成本太高也无法批量生产, 而经基因工程获得的抗菌肽, 其活性要比天然抗菌肽差。随着近十几年的研究, 得到一些解决方案, 但应用于临床还有一段距离。首先抗菌肽用药途径还需要进一步了解和探讨, 此外, 抗菌肽在人体内的毒副作用也需进一步研究。但是, 随着人们对抗菌肽的结构、作用机制的深入了解, 针对性地改造其功能位点, 使抗菌肽抗菌活性得到提升, 不良反应得到缓解。其中 pexiganan 和 IB-367 是分别治疗糖尿病、足感染、口腔感染的药物, 已进入临床研究阶段。相信不久的将来, 抗菌肽将会在临床得到广泛应用。

参考文献:

- [1] Wang GS, Karen MW, Robert WB. Anti-human immunodeficiency virus type 1 activities of antimicrobial peptides derived from human and bovine cathelicidins[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008, 52(9):3438.
- [2] Antimicrob Agents CH, Luque-Ortega JR, Hof WV. Human antimicrobial peptide histatin 5 is a cell-penetrating peptide targeting mitochondrial ATP synthesis in Leishmania[J]. *FASEB*, 2008, 22:1817.
- [3] Wong JH, Ng TB. Sesquin, a potent defensin-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase [J]. *Peptides*, 2005, 26(7):1120.
- [4] Ma D, Wang R, Liao W, et al. Identification and characterization of a novel antibacterial peptide, avian beta-defensin 2 from ducks[J]. *Microbiol*, 2009, 47(5):610.
- [5] Howell SJ, Wilk D, Yadav SP, et al. Antimicrobial poly-

- peptides of the human colonic epithelium[J]. Peptides, 2003,24(11):1763.
- [6] Celikowsra M, Gniecka I, Golda J, et al. Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph[J]. Peptides, 2007, 28: 533.
- [7] Bi CP, Feng XJ, Shan AS. Cloning and expression of a gene encoding shortened LfcinB (1-15)-Melittin (5-12) hybrid peptide in *Escherichia coli* BL21(DE3)[J]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, 2009, 25(7): 975.
- [8] Chen GH, Yin LJ, Chiang IH, et al. Cloning and expression of antibacterial goat lactoferricin from *Escherichia coli* AD494 (DE3) pLysS expression system[J]. J Food Prot, 2008, 71(12): 2523.
- [9] Rao XC, Li S, Jin C. A novel carrier molecule for high-level expression of peptide antibiotics in *Escherichia coli*[J]. Pro Exp Pun, 2004, 36: 11.
- [10] 杨细媚, 文阳安, 万祥辉, 等. 基于序列分析的天蚕素 A 串连融合表达载体的构建[J]. 生物技术通报, 2009, 1: 76.
- [11] Jin FL, Xu XX, Zhang WQ, et al. Expression and characterization of a housefly cecropin gene in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris* [J]. Protein Expression and Purification, 2006, 49: 39.
- [12] Chen GH, Chen WM, Huang GT, et al. Expression of recombinant antibacterial lactoferricin-related peptides from *pichia pastoris* expression system [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(20): 9509.
- [13] Wang A, Wang S, Shen M, et al. High level expression and purification of bioactive human alpha-defensin 5 mature peptide in *Pichia pastoris* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 84(5): 877.
- [14] Liu AY, Destoumieux D, Wong AV, et al. Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation[J]. J Invest Dermatol, 2002, 118(2): 275.
- [15] 赵昆, 刘思国, 王春来, 等. 牛抗菌肽 Bac7-Bac5-βdefense 串联基因在昆虫杆状病毒系统中的表达及其产物的活性分析[J]. 农业生物技术学报, 2008, 16(3): 380.
- [16] Fan B, Li N. Design and synthesis of a Magainin2 fusion protein gene suitable for a mammalian expression system [J]. Transgenic Res, 2009, 18(1): 99.
- [17] 袁红艳, 韩艳非, 朱明光, 等. 人源阳离子抗菌肽 hCAP-18 真核表达载体的构建与表达[J]. 中国生物制品学杂志, 2007, 20(2): 87.
- [18] 文阳安, 杨细媚, 李朴, 等. 携抗菌肽 PR39 基因重组腺病毒的构建及抗胞内伤寒菌研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 2: 131.
- [19] Rozgonyi F, Szabo D, Kocsis B, et al. The antibacterial effect of a proline-rich antibacterial peptide A3-APO[J]. Curr Med Chem, 2009, 16(30): 3996.
- [20] Okuyama-Nishida YU, Akiyama N, Sugimori G, et al. Prevention of death in bacterium-infected mice by a synthetic antimicrobial peptide, L5, through activation of host immunity [J]. Antimicrob Agents CH, 2009, 53(6): 2510.
- [21] Cho WM, Joshi BP, Cho H, et al. Design and synthesis of novel antibacterial peptide-resin conjugates [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2007, 17(21): 5772.

(收稿日期: 2010-01-12 修回日期: 2010-02-25)

• 综 述 •

心肌肥厚相关信号通路的研究进展

刘丽娜 综述, 李法琦 审校

(重庆医科大学附属第一医院老年科 400016)

关键词: 心肌肥厚; 信号通路; 作用机制

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.20.049

中图分类号: R542.202

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)20-2805-04

心肌肥厚是心脏对各种刺激产生的适应性增生, 表现为心肌细胞体积增大, 心脏质量增加, 是独立的心血管危险因素, 最终导致心力衰竭, 甚至猝死。其主要病理变化包括心肌细胞肥大、心肌间质增殖以及心肌细胞外基质重建等, 即心肌重构。心肌肥厚时, 心肌细胞蛋白合成增加、体积增大、直径增宽或长度增加; 心肌肌节数量增多、纤维组织增生、胚胎基因再表达。心肌肥厚的分子机制尚未完全阐明, 主要与细胞信号通路激活密切相关。致心肌肥厚刺激因素可激活 Jak 信号转导子和转录激活子(STAT)信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、Ca²⁺及其依赖的信号通路、Wnt 信号通路、AMP 活化蛋白激酶(AMPK)和 MicroRNAs(miRNA)等多条信号通路且信号通路之间相互作用, 从而导致心肌肥厚。

1 致心肌肥厚刺激因素

多种细胞刺激因素均可导致心肌肥厚。主要包括: (1) 机械牵张, 机械牵张是心肌肥厚最重要的始动因素, 它可以从心肌细胞、局部心肌和整体心肌水平激活其基因表达和促进蛋白质合成。机械牵张引起一些活性肽, 如血管紧张素(Ang) II、内皮素 1(ET-1)及其他生长因子等的合成和释放, 并且在转录水平调节一些即刻早期反应基因的表达, 作用于次级应答基因, 对心肌肥厚起着积极触发作用, 能直接诱导心肌蛋白质合成, 使心肌细胞体积增大。(2) 压力负荷, 压力负荷可以通过儿茶酚胺诱导心肌肥厚, 也可以通过增加局部神经体液因子(如肾素-Ang 系统和 ET 等)或通过跨膜的细胞外基质受体将刺激信号导入细胞内激活心肌肥厚相关信号通路(如 p38MAPK