

哺乳动物抗菌肽研究进展

闫祥洲

(河南省农业科学院畜牧兽医研究所, 河南 郑州 450002)

中图分类号: S859.79⁺7

文献标识码: A

文章编号: 1004-3268(2004)09-0073-04

抗菌肽是生物长期进化过程中保留的先天免疫系统或原生宿主防卫机制中重要的活性分子。其在生物界广泛分布, 目前已从细菌、昆虫、植物以及动物中分离到多种抗菌肽。抗菌肽的抗菌谱广泛, 可以抗细菌、真菌、被膜病毒等多种微生物, 还对支原体、衣原体、螺旋体及一些恶性肿瘤和艾滋病毒具有杀伤作用; 但不破坏动物及人体正常的体细胞, 是吞噬细胞、嗜中性白细胞和巨噬细胞中防御系统的重要活性物质。由于抗菌肽的选择性效应和分子量小、无抗原性等特点, 在面临抗药性和筛选新的抗生素较为困难的今天, 有望成为新一代的抗菌、抗癌药物。

1 哺乳动物抗菌肽的种类与分布

嗜中性白细胞的吞噬体中存在大量的杀菌物质, 自 20 世纪 60 年代开始, 人们便致力于寻找这些杀菌物质, 最后发现是一些带正电荷的肽类, 即抗菌肽。到目前为止, 人们已从不同物种, 包括软体动物、甲壳动物、两栖动物、鸟类、鱼、哺乳动物以及人类共分离到 500 多种抗菌肽。目前, 在哺乳动物中发现的抗菌肽主要有防御素 (defensins) 和 Cathelicidins 两类^[1]。防御素是研究最多也最清楚的抗菌肽, 已从不同的物种分离得到 80 多种 α -、 β - 和 θ - 防御素, 在人类嗜中性白细胞中已发现至少有 6 种 α - 防御素 (HNP-1~4、HD-5、HD-6), 2 种 β - 防御素 (HBD-1、HBD-2), 还有其他多种抗菌肽^[2]。 α - 防御素 HNP-1~3 是人嗜中性白细胞主要的抗菌肽, 其含量约占嗜苯胺蓝体颗粒蛋白质总量的 30%~50%, 而 HNP-4 的含量较低, 约为其他 3 种防御素的

1/100。新近研究发现, 在发炎的口腔唾液、结膜、泪腺及眼泪中均含有大量的 HNP-1~3。在兔的嗜中性白细胞中有 NP-1、NP-2、NP-3a、NP-3b、NP-4、NP-5 六种 α - 防御素, 其总量占细胞蛋白质总量的 15%~20%; 在兔的巨噬细胞中含有 α - 防御素 MCP-1、MCP-2, 但其表达因组织起源及动物年龄不同而有差异。

牛的 β - 防御素是 Diamond 等首次在气管黏膜上皮细胞中发现的短肽, 命名为 TAP。后来又在牛的粒性白细胞中发现了 13 种与 TAP 序列高度同源的 β - 防御素。在牛的舌、气管、牙槽巨噬细胞及小肠细胞中还发现了另外 2 种防御素 LAP 和 EBD。猪的防御素 pBD-1 mRNA 广泛分布于胸腺、脾、肝脏、肾、淋巴结、膀胱、脑、睾丸、肌肉、皮肤、骨髓及心脏等多种器官的组织细胞中; DNA 印迹结果表明, 在猪舌中防御素的含量最多可达 20~100 mg/L。另外, 猪嗜中性白细胞中含有较多的 Cathelicidins。此外, 在鼠、羊、鸡和火鸡中也有大量的 β - 防御素分布。

哺乳动物抗菌肽基因的表达发生在正在分化的嗜中性白细胞、巨噬细胞和上皮细胞中。健康组织上皮细胞中抗菌肽的基因表达水平较低, 然而在蛋白炎症因子、脂多糖 (LPS) 或细菌等刺激因子的作用下, 抗菌肽的含量升高。对昆虫抗菌肽的选择性诱导产生和基因表达调控途径已有所了解, 但对哺乳动物抗菌肽基因表达的调控途径和机制还不清楚。研究发现, 在昆虫抗菌肽基因表达调控中起重要作用的一些蛋白质, 在哺乳动物也发现其对应物, 但还不清楚这些蛋白质是否对哺乳动物有同样或相似的调控作用。

收稿日期: 2004-05-20

作者简介: 闫祥洲 (1971-), 男, 河南信阳人, 助理研究员, 本科, 主要从事畜牧科技开发工作。

2 抗菌肽的抗菌作用机理

目前, 对抗菌肽的抗细菌作用机理有一定的认识。一些学者提出了许多抗菌肽作用机理的假说, 但普遍为人们接受的假说是带正电荷的抗菌肽与带负电荷的细菌细胞膜作用, 破坏细胞膜的完整性, 继而导致细胞死亡。

抗菌肽杀菌作用的具体过程可分为 3 步^[3], 即: (1) 抗菌肽分子通过静电作用结合于细胞膜带负电荷的磷脂双层, 使磷脂双层局部变薄; (2) 在细胞膜电势的作用下, 抗菌肽分子的疏水部分插入细胞膜, 而其两性分子 α -螺旋插入膜内, 多个抗菌肽分子共同形成离子通道, 使膜通透化; (3) 改变细胞膜的通透性及细胞能量状态, 导致细胞膜去极化, 呼吸作用受到抑制以及细胞 ATP 含量严重下降, 最终导致靶细胞死亡。

带正电荷的抗菌肽分子与带负电荷的细菌外膜 LPS 结合, 使正常膜结构被破坏, 从而促进抗菌肽穿透外膜。外膜结构的破坏, 允许多种分子进入菌体内, 包括疏水化合物、小分子蛋白和抗菌化合物; 更重要的是, 可以自我促进抗菌肽的大量吸收。抗菌肽也可促进传统抗生素穿透细菌外膜, 这可能是抗菌肽增强抗生素作用效果的主要原因。

近来的试验表明, 某些抗菌肽可能作用于细菌 DNA 而调控基因的表达, 如乳铁蛋白的 N-末端可与 DNA 的特定区域结合, 抗菌肽 PR-3 对大肠杆菌的作用可能是通过影响基因的表达及蛋白质合成而实现的。也有学者认为, 某些抗菌肽是通过与微生物细胞膜表面的“受体”蛋白结合而发挥作用的。从目前的研究结果来看, 不同的抗菌肽可能其作用机制不同, 而同一种抗菌肽作用于不同种微生物时, 其作用模式可能也有差异。抗菌肽与许多蛋白质, 如乳铁蛋白、溶菌酶、杀菌/渗透作用促进蛋白(BPI)、磷脂酶 A2、白细胞蛋白酶分泌抑制因子(SLPI)以及补体系统等协同作用, 完成抗菌作用以及其他功能^[4]。

3 抗菌肽的分离提纯方法

3.1 批量分离

批量分离可以高效地从样品中浓缩分离目标抗菌肽, 所涉及的样品前处理步骤较少, 可作为动

物生理液、细胞和组织样品的初步分离提取手段。用浓度为 5% ~ 10% 的乙酸溶液处理生理液, 可以选择性变性和沉淀许多大分子蛋白质, 而将抗菌肽保留在溶液中。用阳离子交换树脂在中性或微酸性条件下吸附溶液中的抗菌肽, 然后用 5% ~ 10% 的乙酸溶液洗脱。收集的抗菌肽可用凝胶色谱法进一步纯化。

3.2 凝胶过滤

抗菌肽分子量小, 常用凝胶过滤色谱法进行第 1 步纯化, 可用于多种物种来源的抗菌肽, 如青蛙、鱼、马等。

3.3 乙酰脲聚丙烯酰胺凝胶电泳

乙酰脲聚丙烯酰胺凝胶电泳(AU-PAGE)根据不同肽类或蛋白质所带正电荷的密度不同而将其分离, 适合于抗菌肽的分析。待分离样品先用考马氏亮蓝或银染法进行染色后与肽标样同时电泳, 碱性氨基酸残基较多且分子量较小的抗菌肽, 比那些分子量较大或带正电荷较少的肽或蛋白质向阴极的迁移速度更快。

3.4 高效液相色谱法(HPLC)和质谱法

HPLC 法是一种高效的纯化抗菌肽的方法, 常用的 HPLC 方法有阳离子交换色谱和反相色谱法。阳离子交换色谱法的主要缺点是其纯化效率较低, 并且其纯化后的样品在分析抗菌活性前需脱盐。反相色谱法常用于对阳离子交换色谱法分离后的样品进行脱盐以及进一步纯化, 以备抗菌活性分析。对于纯化后的抗菌肽, 除了可用传统的质谱法分析外, 还可应用电喷雾质谱或 MALDI-TOF 质谱。这些技术目前正普遍用于研究真核生物细胞、组织和生理液中的抗菌肽。

3.5 存储条件和操作溶液

在极端条件下, 如高热和低 pH 值, 许多抗菌肽性质稳定。因此, 一般只要将样品保存在 -4 °C 即可保持其活性。已知的所有抗菌肽均可用微酸性溶液如 0.01% 乙酸(pH 3.5 ~ 4.0)稀释和保存。抗菌肽在 0.01% 乙酸溶液中溶解度较高(1 ~ 10 mg/ml), 而且酸性环境可减少抗菌肽被蛋白质水解酶破坏的机会。

4 抗菌肽的抗菌活性检测方法

4.1 径向扩散法

径向扩散法(RDA)直接检测样品对固定在

载体上微生物的生长抑制效果,是目前测定抗菌肽活性最灵敏、重现性最好的方法。样品中的抗菌肽经过一定时间的径向扩散与固定在琼脂糖中的微生物接触,从而抑制微生物的生长,在琼脂糖板上形成明显的抑菌透明带。RDA 法主要缺点是仅适合于测定单一物质或成分较少的混合物,而复杂样品和生理液由于其组分扩散速率不同而不能准确测定其活性。

4.2 凝胶覆盖法

凝胶覆盖法(GOA)可以直接测定复杂样品中各组分的抗菌活性。但比 RDA 法所需的样品量大,而且如果样品组分在 AU—PAGE 电泳中分离不好时,很难准确测定其活性。

4.3 菌落形成单位法

菌落形成单位法(CFU Assay)被认为是测定物质抗菌活性的“黄金标准”方法,可以测定单一组分、多种肽混合物以及生理体液的抗菌活性。处于对数生长期的微生物与待测样品共培养一定时间后,计算菌落数而评定样品的抗菌活性。CFU 法的优点是可以不需要分离或稀释而直接测定复杂样品的总抗菌活性。

4.4 微量营养汤稀释法

微量营养汤稀释法是国家临床实验标准委员会认可的方法。待测样品与微生物在 37℃条件下培养过夜,然后测定培养液在 600 nm 处的 OD 值,确定最低抑制浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)。微量营养汤稀释法是所需样品量为 RDA 法的 10 倍以上,并且不能测定完整生理体液的抗菌活性。因此,常用于测定样品量较大、纯化程度较高的某一种抗菌肽单独作用时或与其他肽类以及抗生素协同作用时的活性。

5 抗菌肽的应用前景

哺乳动物抗菌肽对许多致病菌,如伤寒杆菌、致病性大肠杆菌、硝酸盐杆菌等均有抗菌作用^[5]。在临床上,一些对某些常用的抗生素具有耐药性的致病菌,许多抗菌肽对其也具有很好的杀灭作用。真菌病害也是目前难以解决的问题,而抗菌肽无疑为其治疗提供了新的手段。抗菌肽还能攻击某些病毒和原虫。更为引人关注的是,抗菌肽对癌细胞、艾滋病病毒具有杀伤作用,同时其良好的选择性使其对机体正常的 B 淋巴细胞

无任何不良作用,而该特征正是目前广泛使用的肿瘤化疗药所不具备的。此外,大量的研究表明,抗菌肽无致畸变作用,无蓄积毒性,且不易产生抗药性。由此看来,在目前许多病原菌对已有抗生素逐渐产生耐药性,而新的抗生素发现又极其困难的情况下,抗菌肽极有可能成为抗菌素、抗病毒药以及抗肿瘤药的新来源。动物试验表明,抗菌肽无论是单独作用或与传统抗生素协同作用均可抵抗局部和整体的微生物感染。利用抗菌肽的抑菌特性,调节动物的消化系统、神经内分泌系统和免疫机能,减少抗菌素的使用,改善动物生产的安全性,提高畜禽生产效益。从天然免疫系统中发现和探索天然抗菌肽,已从近几年发展起来。人们根据抗菌肽的结构和功能分析,已合成出上千种抗菌肽。新近的一些研究和产品开发使抗菌肽有望成为抗耐药性菌株的有效治疗药物,具有广阔的应用前景。

但是,抗菌肽要成为临床上使用的药物,还有一些问题需要解决。首先是抗菌肽的生产问题。由于抗菌肽的天然资源有限,很难满足人医和兽医临床,甚至动物生产中应用的需要。化学合成和基因工程便成为获得抗菌肽的主要途径。化学合成肽类容易进行结构改造或修饰,但其成本较高。通过基因工程在微生物中直接表达抗菌肽基因,目前还存在技术上的困难,即可能造成宿主微生物自杀而不能获得产物。以融合蛋白的形式表达抗菌肽虽然可以克服这一障碍,但也存在产物少的问题^[6]。因此,如何提高抗菌肽的生产效率,降低成本,是应用抗菌肽必须解决的首要问题。其次,与目前临床广泛使用的传统抗生素相比,抗菌肽的抗菌活性还不够强。对已发现的抗菌肽进行结构改造以及设计新的抗菌肽分子是提高抗菌活性的有效途径,因此需要进一步研究其结构和功能的关系。

参考文献:

[1] Ramanathan B, Davis EG, Ross CR, et al. Lathlicidins: microbicidal activity, mechanism of action, and roles in innate immunity [J]. *Microbes Infect*, 2002, 4: 361—372.
[2] Gans T, Weiss J. Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia [J]. *Semin Hematol*, 1997, 34: 343.

新城疫的分子生物学诊断技术

程相朝¹, 张春杰¹, 李慧琴², 李银聚¹

(1 河南科技大学动物科技学院, 河南 洛阳 471003; 2 汝州市成人中专)

中图分类号: S852.65⁺9.5 文献标识码: A 文章编号: 1004—3268(2004)09—0076—03

随着新城疫病毒(NDV)分子结构、分子结构与致病性关系、强弱毒株分子结构差异等研究的深入, 为新城疫(ND)分子水平上的特异性诊断技术, 特别是从病原体检测角度建立特异性诊断技术奠定了基础。其中, 发展比较快的有单克隆抗体技术、RNA 指纹图谱技术、核酸探针技术和基因片段的体外扩增技术等。这些技术不仅用于新城疫病毒的检测、鉴定、特性研究及致病型的确定等, 还可以据此追踪病毒的来源及流行情况。笔者仅就新城疫分子生物学诊断常见技术目前的研究情况简要综述如下。

1 单克隆抗体技术

传统的血清学技术检测认为, NDV 只有一个血清型, 而单抗可直接检测抗原性的微小变化, 甚至单个氨基酸的变化也能检出, 从而使特异单抗成为区别 NDV 各毒株抗原性差异的有效手段, 可有效解决常规单因子血清在副黏病毒血清型间的交叉反应。1989 年, Dellaporta 等用 V4 株建立了一组特异性单抗制剂, 不仅能区别 NDV 的自然感染和人工免疫, 而且与其他副黏病毒属病毒不发生交叉反应。因大多数单抗不能直接检测所有 NDV 的保守抗原位点, Meulemans 等^[1]曾用不

同特异性单抗混合应用取得了较好的效果。Alexander 等根据病毒与不同 F 和 HN 蛋白单抗的反应能力将 NDV 各毒株分类, 能与同一组单抗反应的病毒具有共同的生物学和流行病学特性。由于在疫病流行期间病毒相对比较稳定, 使得能对病毒的来源及传播进行有价值的推测。此外, 用单抗分型确定了引起鸽新城疫大流行的 NDV 变异株, 根据病毒与单抗结合的独特类型, 证实了 15 个国家的鸽子中存在着同一变异株。Gorman 等^[2]在对毒力不同的 4 株澳大利亚 NDV 毒株 HN 和 F 蛋白氨基酸序列分析的基础上, 采用生物化学方法人工合成了 HN 和 F 蛋白的特异结构多肽, 并制备出了相应的抗多肽抗体。用免疫印迹方法对上述 4 个 NDV 毒株进行了鉴别, 证明能明显区别 4 个 NDV 毒株。Hodder 等^[3]利用强毒株 Australia—ricciortorta(AV)、弱毒株 Queenstand(V4)、Eaves—Grimes(EG)和 WaZU6 株 F 蛋白裂解位点区的氨基酸组成不同, 设计并人工合成了 2 个多肽; 针对强弱毒株序列的不同, 将 2 个多肽分别与载体蛋白连接制备出抗强毒株多肽和抗弱毒株多肽抗体, 这两种抗体能有效地区别 NDV 强弱毒株。王树双等^[4]参考 Gorman 的方法, 制备了 6 种抗不同毒力 NDV F 蛋白裂解位

收稿日期: 2004—04—14

作者简介: 程相朝(1966—), 男, 河南汝州人, 教授, 博士, 主要从事畜禽疫病防制的教学和科研工作。

- [3] Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipids bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides[J]. Biophys Biophysica Acta, 1999, 1672: 55—70.
- [4] Shi J, Zhang G, Wu H, et al. Porcine epithelial β -defensin I is expressed in the dorsal tongue at antimicrobial concentrations[J]. Infect Immun, 1999, 67(6):

3 121—3 127.

- [5] 温刘发, 张常明, 付林, 等. 抗菌肽制剂代替抗生素在断奶仔猪饲料中的应用效果[J]. 中国饲料, 2001, (18): 13—14.
- [6] Kevin LP, Melissa HB, Rober EW. Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptide in bacteria[J]. Gene, 1993, 134: 7—13.