

抗菌肽 Protegrin-1 与抗生素对致病性大肠杆菌的体外联合药效

王国栋

(安阳工学院 生物与食品工程学院, 河南 安阳 455000)

摘要: 为研究抗菌肽 Protegrin-1 (PG-1) 的抑菌效果及其与抗生素之间的协同效应关系, 应用基因工程方法表达 PG-1; 测定几种常用的抗菌药物 (四环素、丁胺卡那霉素和多黏菌素 B 等) 对致病性大肠杆菌的最小抑菌浓度 (MIC), 并分别检测其与 PG-1 联用后的抗菌效果, 采用分级抑制浓度指数 (FIC) 来分析 PG-1 与抗生素之间的抗菌作用关系, 并进一步检测联合应用对细菌裂解率的影响。结果显示, PG-1 与多黏菌素 B、丁胺卡那霉素及四环素联用对大肠杆菌有协同作用, 且 PG-1 与多黏菌素 B 联用可以提高细菌裂解率。PG-1 与一些抗生素存在协同或者相加作用, 临床上使用 PG-1 可以在一定程度上减少甚至替代抗生素的使用。

关键词: 抗菌肽; 抗生素; 致病性大肠杆菌; 体外联合药效; FIC

中图分类号: S859.79⁺7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)08-0124-04

Interaction *in Vitro* between Antibacterial Peptide Protegrin-1 and Antibiotics to Pathogenic *E. coli*

WANG Guo-dong

(College of Biology and Food Engineering, Anyang College of Technology, Anyang 455000, China)

Abstract: To investigate the antibacterial activity of protegrin-1 and its synergic interaction with antibiotics, the Protegrin-1 was expressed in *P. pastoris*. Nine clinically used antibiotics, including tetracycline, amikacin sulfate, polymyxin B, cefradine, florfenicol, ciprofloxacin, norfloxacin, levofloxacin, streptomycin sulfate, were selected. *In vitro* antibacterial activities of the porcine antibacterial peptide Protegrin-1, alone or in combination with the antibiotics were measured by MIC. Synergy was surveyed when the antibacterial peptide was combined with the nine clinically used antibiotics by FIC. In the end, the bacterial lysis of Protegrin-1 was detected. The results showed that the antibacterial peptide had synergic interaction with amikacin, tetracycline and polymyxin B. The lysis rate of *E. coli* was increased substantially in the presence of the combination of Protegrin-1 and polymyxin B. The results demonstrated that the effect of combination was synergistic or enhancement. The antibacterial peptide can reduce the using of antibiotics, and further studies are needed to analyze the antibacterial mechanism and their relationship.

Key words: antibacterial peptides; antibiotics; pathogenic *E. coli*; synergism; FIC

抗菌肽作为一种免疫效应因子, 在机体的先天性免疫中起重要作用。随着人们对抗菌肽抗菌机制和抗生素耐药机制的深入研究, 发现抗菌肽与某些抗生素在抗菌过程中存在协同性。Giacometti 等^[1]研究发现, 抗菌肽 Buforin II、天蚕素 P1、马甘宁 II 分别与青霉素、头孢他啶、美洛培南、克拉霉素联合

应用中存在协同作用, 可以增强对嗜麦芽寡食单胞菌的抗菌活性; Zhang 等^[2]合成的富含脯氨酸的抗菌肽与多黏菌素 E 等抗生素联合使用可增强对大肠杆菌 UB1005 的抗菌活性; Ulvatne 等^[3]设计了 5 种不同的短肽, 分别与红霉素或利福平联用, 对大肠杆菌具有协同作用; Simonetti 等^[4]研究了速普

收稿日期: 2013-05-15

作者简介: 王国栋 (1978-), 男, 河南汤阴人, 讲师, 硕士, 主要从事动物医学方面的教学和科研工作。E-mail: wgdecpc@sina.com

肽对 20 株临床分离的具有多重耐药性的绿脓假单胞菌的体外抗菌活性,分级抑制浓度指数(FIC)表明,速普肽与 β -内酰胺类抗生素和多黏菌素 E 有协同杀菌作用。以上研究结果表明,抗菌肽与抗生素的协同应用,可以减少临床上抗生素的使用剂量,对抗菌药物的开发和应用具有深远意义,但目前国内在这方面的研究报道还较少。

Protegrins 是猪白细胞合成并分泌的含 2 个二硫键的阳离子抗菌肽,具有广谱抗菌和抗病毒活性。至今,已有 5 种这类抗菌肽被鉴定^[5],即 PG-1—PG-5。Protegrin-1 由 149 个氨基酸构成,其成熟肽段(以 PG-1 表示)仅 18 个氨基酸,约为 2.3 kD,体外表达及活性研究已经证明,其具有良好的抗菌活性^[6-9]。本研究采用基因工程方法在巴斯德毕赤酵母中表达了 Protegrin-1,比较了 PG-1 与 9 种常用抗菌药物对常见的致病性大肠杆菌的体外抗菌活性及联合药效,为抗菌肽的开发应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、受体菌 巴斯德毕赤酵母(*P. pastoris*)受体菌 X-33、表达载体 pPICZ α A 等购于 Invitrogen 公司。

1.1.2 试剂及培养基 Zeocin、生物素、Taq 酶、限制性内切酶、连接酶等购自 TaKaRa 公司,SDS-PAGE 低分子量 Marker、Tricine、Tris、His·Bind 螯合层析柱等均购自生工生物工程(上海)技术有限公司,水解酪蛋白、营养琼脂等购自青岛博维生物技术有限公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 抗生素 四环素(TET)、丁胺卡那霉素(AMI)、多黏菌素 B(PB)、先锋 VI(CEF)、氟苯尼考(FLO)、环丙沙星(CIP)、诺氟沙星(NOR)、左氧沙星(LEV)及硫酸链霉素(STR)均购自安阳好一生大药房。

1.1.4 大肠杆菌菌株 大肠杆菌 LYP09 和 LYC09 为安阳生物与食品工程学院实验室分离保存。药敏试验检测 LYP09 和 LYC09 对 AMI、PB 均敏感,而 LYP09 对 FLO、LEV、STR、CIP 严重耐药,LYC09 对 CEF、TET、NOR 严重耐药。

1.2 方法

1.2.1 克隆猪抗菌肽 PG-1 成熟肽段 用 Primer 5.0 设计 2 条引物,上游引物:5'-TCG-TACTCGAGAAAAGAAGAGGTGGTAG-3',下游引物:5'-CTCCGTCTAGATTAATGATGATGATGATGATGACCAGCAATTCTAA-3',并在

PG-1 成熟肽段 C 末端加入 6 个 His。以本实验室保存的 pPICZ α A-CP 质粒为模板,扩增猪 PG-1 成熟肽段。

1.2.2 猪抗菌肽 PG-1 成熟肽段的表达及纯化 参照 Invitrogen 公司酵母表达操作手册,将 PG-1 基因片段克隆至 pPICZ α A 载体,构建表达载体 pPICZ α A-PG,线性化后电击转化酵母菌 X-33,筛选阳性重组子进行诱导表达,表达产物用 Tricine-SDS-PAGE 电泳检测。对阳性重组菌批量诱导表达,用 His·Bind 螯合层析柱纯化,用 DNA/RNA 微量定量仪测定 PG-1 浓度。

1.2.3 抗菌肽或抗生素最小抑菌浓度(MIC)的测定 将 50 μ L 抗菌肽(或抗生素)于 96 孔板中进行倍比稀释,然后加入 100 μ L 10^6 cfu/mL 的测试菌液。另设 1 组 100 μ L LB 培养液、1 组 100 μ L 测试菌液作为对照,37 $^{\circ}$ C、150 r/min 培养 12 h,用酶标仪测定在 600 nm 处的吸光值。抗菌肽(抗生素)设 3 个不同质量浓度的重复,与对照组 LB 培养液比较,以含抗菌肽(抗生素)最高稀释孔中不生长细菌的质量浓度作为 MIC。

1.2.4 抗菌肽与抗生素协同性测定 抗菌肽与抗生素的协同作用用 FIC 来定量检测:

$$FIC = \text{单独 MIC}_A / \text{联合 MIC}_A + \text{单独 MIC}_B / \text{联合 MIC}_B$$

结果判定标准参照文献[10]的方法:协同关系, $FIC \leq 0.5$;相加作用, $0.5 < FIC < 1.0$;不相关, $1 \leq FIC < 2$;拮抗, $FIC \geq 2$ 。

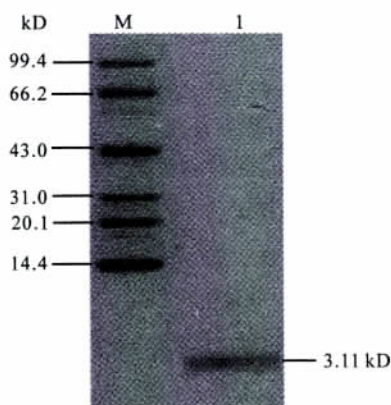
分别测得抗菌肽和抗生素 MIC 后,取 $4 \times MIC$ 的抗菌肽与 $4 \times MIC$ 的抗生素各 75 μ L 加入 96 孔微量培养板的试验孔中,连续倍比稀释,稀释至第 20 个试验孔,然后每孔加入 100 μ L 的待测菌液(10^6 cfu/mL),另设 1 组 250 μ L LB 培养液、1 组 250 μ L 菌液作为对照。37 $^{\circ}$ C 培养 12 h,用自动酶标仪测定在 600 nm 处的吸光值,计算出共同培养时抗菌肽与抗生素的 MIC。

1.2.5 抗菌肽与抗生素的细菌裂解试验 选取与 PG-1 具有协同作用的抗生素,参照文献[11]的方法进行试验。将 10 mL 菌液 8 000 g、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,收集菌体,重悬于 5 mL 20 mmol/L 的 PBS (pH 值 6.5)中。在 96 孔板中每孔加入 125 μ L 上述制备好的菌悬液,再加入 PG-1 和抗生素 125 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 18 h,在 0、3、9、18 h 时用分光光度计测量 650 nm 处的吸光值。细胞裂解率以 $(100 - A_t/A_0 \times 100)$ 表示, A_t 和 A_0 分别代表加药物孔和不加药物孔的吸光值。

2 结果与分析

2.1 猪抗菌肽 PG-1 的表达与纯化

PG-1 酵母表达产物经纯化后进行 Tricine-SDS-PAGE 电泳显示,PG-1 大小约 3.11 kD(图 1),纯化后 PG-1 质量浓度为 188 $\mu\text{g/mL}$ 。



M. 蛋白质低分子量标准; 1. PG-1

图 1 PG-1 表达产物纯化后的 Tricine-SDS-PAGE 电泳图谱

2.2 抗菌肽和抗生素单独应用时对细菌的 MIC

从表 1 可以看出,PG-1 对致病性大肠杆菌 LYP09、

LYC09 的 MIC 分别为 4.700 $\mu\text{g/mL}$ 和 7.050 $\mu\text{g/mL}$,效果不及 AMI(0.385 $\mu\text{g/mL}$)和 PB(0.058 $\mu\text{g/mL}$),但优于其他几种抗生素。

2.3 抗菌肽与抗生素的联合应用分析

由表 2 可以看出,PG-1 与 AMI、TET、PB 联合应用时对 2 株大肠杆菌的抗性均表现出协同作用($\text{FIC} \leq 0.5$),与 CIP、FLO 及 STR 联合应用时则表现为相加作用($0.5 < \text{FIC} < 1.0$),而与 CEF、NOR 和 LEV 联合应用时则表现为不相关作用($1 \leq \text{FIC} < 2$)。

以上结果表明,PG-1 与抗生素联合使用时,与不同抗生素的相互作用关系并不相同,这可能与抗生素种类及杀菌机制有密切关系。

2.4 PG-1 及 PB 的细菌裂解效果

由图 2 可见,PG-1(A; 1.18 $\mu\text{g/mL}$)、PB(A; 0.014 $\mu\text{g/mL}$)对 LYP09 单独作用 18 h 后的裂解率分别为 34.8% 和 39.8%,而 PG-1(A)、PB(A)联合应用在 3 h 和 18 h 的裂解率分别为 34.8% 和 68.9%。PG-1(B; 0.56 $\mu\text{g/mL}$)、PB(B; 0.017 $\mu\text{g/mL}$)对 LYP09 单独作用 18 h 后的裂解率分别

表 1 抗菌肽与抗生素单独及联合应用时对大肠杆菌的 MIC

$\mu\text{g/mL}$

抗菌肽/ 抗生素	菌株 LYP09			菌株 LYC09		
	单用	联用		单用	联用	
		PG-1	抗生素		PG-1	抗生素
PG-1	4.700 \pm 0.21	/	/	7.050 \pm 0.25	/	/
CIP	>125.000 \pm 0.28	2.35 \pm 0.24	62.500 \pm 0.21	62.500 \pm 0.31	3.530 \pm 0.31	15.630 \pm 0.21
FLO	>128.000 \pm 0.26	2.35 \pm 0.22	128.000 \pm 0.29	128.000 \pm 0.25	3.530 \pm 0.24	16.000 \pm 0.28
PB	0.580 \pm 0.32	1.18 \pm 0.21	0.070 \pm 0.31	0.580 \pm 0.28	0.885 \pm 0.24	0.070 \pm 0.27
NOR	32.000 \pm 0.29	2.35 \pm 0.23	16.000 \pm 0.21	>64.000 \pm 0.27	3.530 \pm 0.31	64.000 \pm 0.29
TET	128.000 \pm 0.21	1.18 \pm 0.31	16.000 \pm 0.25	>256.000 \pm 0.26	0.885 \pm 0.41	32.000 \pm 0.31
AMI	0.385 \pm 0.41	0.59 \pm 0.31	0.096 \pm 0.29	0.385 \pm 0.31	0.442 \pm 0.27	0.048 \pm 0.31
STR	>256.000 \pm 0.26	1.18 \pm 0.27	128.000 \pm 0.22	128.000 \pm 0.31	0.442 \pm 0.27	64.000 \pm 0.23
CEF	64.000 \pm 0.31	2.35 \pm 0.28	64.000 \pm 0.24	>128.000 \pm 0.23	3.530 \pm 0.23	64.000 \pm 0.25
LEV	>124.000 \pm 0.22	2.35 \pm 0.25	62.000 \pm 0.21	62.000 \pm 0.25	3.530 \pm 0.29	62.000 \pm 0.26

表 2 抗菌肽与抗生素联合作用时对细菌的 FIC

抗生素	菌株 LYP09	菌株 LYC09
CIP	<1**	0.750**
FLO	<1**	0.625**
PB	0.372*	<0.246*
NOR	1**	<1.5 Δ
TET	0.376*	0.250*
AMI	0.375*	0.187*
STR	<0.75**	0.563**
CEF	1.5 Δ	<1**
LEV	<1**	1.5 Δ

注: * 协同作用; ** 相加作用; Δ 不相关作用。

为 39.7% 和 43.8%,而 PG-1(B)和 PB(B)联合应用在 3 h 和 18 h 的裂解率分别为 36.4% 和

78.7%。从上述结果可以看出,PG-1 与 PB 联合应用可以提高细菌裂解率。

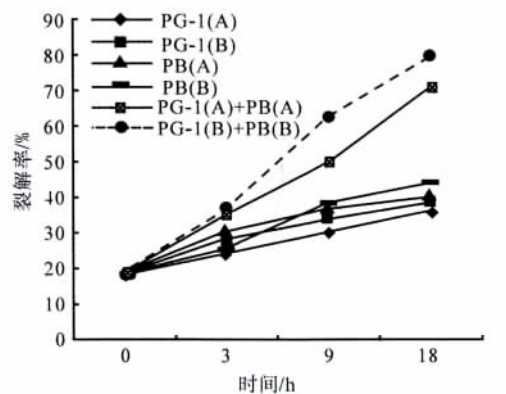


图 2 PG-1、PB 单独及联用时 LYP09 的细菌裂解率

3 讨论

抗菌肽具有分子量小、不易产生耐药性、广谱抗菌、稳定性高、活性高等特点^[12-15]。不仅对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌具有活性,且对真菌、肿瘤、病毒(如流感病毒、疱疹病毒、人类 HIV 病毒)等也有很强的杀伤力^[16-17]。抗菌肽一般通过识别和结合细菌的细胞膜成分和表面离子,造成细胞破裂来杀灭细菌。由于细菌细胞膜的固有成分不易产生变化,因此不易产生耐药性。

本研究发现,PG-1 与丁胺卡那霉素、四环素及多黏菌素 B 等联用具有不同程度的协同作用。抗生素对病原菌的作用机制主要是干扰和阻碍病原菌的正常生物化学代谢过程,影响病原菌的结构与功能,使其丧失生长繁殖的能力而达到抑制或杀灭病原菌的作用。研究表明^[17-21],PG-1 可以作用于细菌脂质双层膜,降低膜的厚度,增加膜的通透性,甚至在细胞膜上形成离子通道。推测 PG-1 与这几种抗生素具有协同作用是由于抗菌肽与细菌细胞壁、膜交互作用,使细菌对药物的主动外排系统破坏,抗菌肽与抗生素大量进入,导致细菌的染色体、核糖体不能合成,造成菌体快速死亡,从而表现出协同抗菌作用^[22]。但 PG-1 与抗生素之间并非都存在协同关系,与先锋Ⅵ、左氟沙星及诺氟沙星之间表现为不相关。由于各种抗菌肽的抗菌机制不同,各种抗生素的杀菌机制也不同,因此,抗菌肽与抗生素之间的相互关系需要具体研究,且它们之间相互关系的具体机制有待进一步研究。

本试验初步研究了抗菌肽 PG-1 与几种临床常用抗生素联合使用时的作用,发现其与一些抗生素联合应用具有协同或相加作用,这对于临床减少抗生素的使用极有意义,但其作用机制还需进一步研究。

参考文献:

- [1] Giacometti A, Cirioni O, DelPrete M S, *et al.* *In vitro* activities of membrane active peptides alone and in combination with clinically used antimicrobial agents against *Stenotrophomonas maltophilia* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(6): 1716-1719.
- [2] Zhang L, Roland B, Robert E, *et al.* Influence of proline residues on the antibacterial and synergistic activities of α -helical peptides [J]. *Biochemistry*, 1999, 38(23): 8102-8111.
- [3] Ulvatne H, Karoliussen S, Stiberg T, *et al.* Short antibacterial peptides and erythromycin act synergically against *Escherichia coli* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 48(2): 203-208.
- [4] Simonetti O, Ganzetti G, Arzeni D, *et al.* *In vitro* activity of tachyplesin III alone and in combination with terbinafine against clinical isolates of dermatophytes [J]. *Peptides*, 2009, 30(10): 1794-1797.

- [5] Shi J, Ganz T. The role of protegrins and other elastase-activated polypeptides in the bactericidal properties of porcine inflammatory fluids [J]. *Infect Immun*, 1998, 66: 3611-3617.
- [6] Joanna W S, Barbara M D, Anna S. Analysis of antimicrobial peptides from porcine neutrophils [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2010, 83: 8-12.
- [7] Sang Y, Blecha F. Porcine host defense peptides: Expanding repertoire and functions [J]. *Dev Comp Immunol*, 2009, 33: 334-343.
- [8] Ramanathan B, Davis E G, Ross C R, *et al.* Cathelicidins: Microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity [J]. *Microb Infect*, 2002, 4: 361-372.
- [9] 牛明福. 富含不同氨基酸抗菌肽的表达及其生物学活性的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2007.
- [10] Hall M J, Middleton R F, Westmacott D. The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy [J]. *J Antimicrob Chemother*, 1983, 11(5): 427-433.
- [11] Naghmouchi K, Drider D, Fliss I. Action of divergicin M35, a class II bacteriocin, on liposomes and *Listeria* [J]. *J Appl Microbiol*, 2007, 102: 1508-1517.
- [12] 胡瑞萍, 张铎, 张丽萍, 等. 枯草芽孢杆菌 BSD-2G 一种抗菌肽的分离纯化与鉴定 [J]. *华北农学报*, 2011, 26(6): 201-206.
- [13] 索相敏, 陆秀君, 董建臻, 等. 2 种昆虫高活性抗菌肽制备方法的优化 [J]. *华北农学报*, 2007, 22(3): 119-122.
- [14] 莫瑾, 方俊, 蒋红梅, 等. 抗菌肽的研究进展 [J]. *现代农业科技*, 2006(7): 102-103.
- [15] 陆琪. 抗菌肽及其在畜牧业中的应用 [J]. *现代农业科技*, 2008(8): 167-168.
- [16] Paulina K B, Abel G O, Ana M P, *et al.* Identification of immunodominant antigens of *Mycobacterium bovis* by expression library immunization [J]. *The Veterinary Journal*, 2011, 190: 181-183.
- [17] 沈建忠. *动物毒理学* [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 92-93.
- [18] Bolinteanu D S, Langham A, Davis H T, *et al.* Molecular dynamics simulations of three protegrin-type antimicrobial peptides: Interplay between charges at the termini, β -sheet structure and amphiphilic interactions [J]. *Mol Simul*, 2007, 33: 809-819.
- [19] Bolinteanu D S, Sayyed-Ahmad A, Davis H T, *et al.* Poisson-Nernst-Planck models of nonequilibrium ion electrodiffusion through a protegrin transmembrane pore [J]. *PLoS Comput Biol*, 2009, 5(1): e1000277.
- [20] Bond P J, Khalid S. Antimicrobial and cell-penetrating peptides: Structure, assembly and mechanisms of membrane lysis via atomistic and coarsegrained molecular dynamics simulations [J]. *Protein Pept Lett*, 2010, 17(11): 1313-1327.
- [21] Capone R, Mustata M, Jang H, *et al.* Antimicrobial protegrin-1 forms ion channels: Molecular dynamic simulation, atomic force microscopy, and electrical conductance studies [J]. *Biophys J*, 2010, 98(11): 2644-2652.
- [22] Giacometti A, Cirioni O, Delprete M S, *et al.* Comparative activities of polycationic peptides and clinically used antimicrobial agents against multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2000, 46(5): 807-810.