

昆虫抗菌肽的研究进展

李赛男

(肇庆学院 生物学系, 中国广东 肇庆 526061)

摘要: 昆虫抗菌肽是昆虫免疫后存在于血淋巴中的一类肽类活性物质, 具有相对分子质量小、热稳定性强、无免疫原性、抗菌谱广等特点。结合昆虫抗菌肽的研究现状和发展前景, 对昆虫抗菌肽的分类、作用机理、基因工程等方面进行了综述。

关键词: 昆虫抗菌肽; 作用机理; 基因工程

中图分类号: Q933

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2006)S2-0056-05

Progress on Insect Antibacterial Peptides

LI Sai-nan

(Biology Department, Zhaoqing University, Zhaoqing 526061, Guangdong, China)

Abstract: Insect antibacterial peptides are kinds of bioactive peptides in hameolymph for insect immunization. They possess specific characters, such as small molecular weight, heat-durability, broad-spectrum antibiotic and without immunity original nature. The types, mechanism, genetic engineering of insect antibacterial peptides are briefly reviewed.

Key words: insect antibacterial peptides; mechanism; genetic engineering

(*Life Science Research*, 2006, 10(4)S2: 056 ~ 060)

昆虫是世界上最大的生物种群, 昆虫中的许多种类都是人类疾病的重要传播媒介, 传播的病原体有病毒、细菌和原虫等, 对人类危害极大, 但昆虫本身却能抵御各种病原体并在千变万化的自然界中占据极大的生存优势。随着对昆虫学研究的进一步深入, 人们发现昆虫虽然没有完善的免疫防御体系, 但却具有高效的无细胞免疫系统。20 世纪 70 年代, 瑞典科学家 Boman^[1] 领导研究小组首次从经非致病细菌刺激的惜古比天蚕 (*Hyalophora cecropia*) 血淋巴中分离出一类新的碱性抗菌多肽——天蚕素 (cecropin)。迄今为止,

在鳞翅目、双翅目、鞘翅目、半翅目、等翅目、膜翅目、毛翅目和蜻蜓目等 8 个目的昆虫中发现超过 200 多种昆虫抗菌肽类物质。昆虫抗菌肽是经特定外界条件诱导, 由昆虫细胞特定基因编码的抵御外界微生物侵害, 清除体内突变细胞的一类防御性肽类活性物质。它具有相对分子质量小、热稳定性强、无免疫原性、抗菌谱广、作用机制独特、对高等动物正常细胞无害等特点^[2]。现在, 抗菌肽被认为是从细菌到高等哺乳动物普遍存在的一类防御性多肽, 称之为“第二防御体系”。抗菌肽不仅抗菌谱广, 而且可以抑杀某些真菌和膜病毒,

收稿日期: 2006-10-28; 修回日期: 2006-11-28

基金项目: 广东省肇庆市科技项目 (203301)

作者简介: 李赛男 (1979-), 女, 湖南邵阳人, 助教, 硕士, 主要从事昆虫杆状病毒方面的研究。Tel: 0758-2751366, E-mail: lisainanlsn@yahoo.com.cn.

对衣原体、支原体、螺旋体、肿瘤细胞和艾滋病病毒也有一定作用^[3]。近年来,对昆虫抗菌物质的研究,特别是对昆虫抗菌肽的研究已成为一个迅速发展新领域,越来越引起人们的关注和重视。本文就昆虫抗菌肽的分类、作用机理、基因工程等工作一综述。

1 昆虫抗菌肽的分类

昆虫抗菌肽是昆虫体液免疫体系的重要成分。根据氨基酸组成和结构特点,昆虫抗菌肽大致分为以下4类,即以 cecropin 为代表性的不含半胱氨酸残基(Cys)的抗菌肽类;以昆虫防御素(insect defensin)为代表的富含半胱氨酸残基的抗菌肽类;以蜜蜂肽(apidaecin)为代表的富含脯氨酸残基(Pro)的抗菌肽类;以攻击素(attacin)、麻蝇毒素Ⅱ(sarcotoxin Ⅱ)等为代表性的富含甘氨酸残基(Gly)的抗菌肽类。

1.1 不含半胱氨酸残基的抗菌肽类

cecropin 是此类的代表,是最早被发现的昆虫抗菌肽,它对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都有较高的抗性,但对霉菌和其他真核细菌无细胞毒性作用。目前发现了约30种 cecropin,这些 cecropin 的分子结构相似:均为线型阳离子多肽,由31~39个氨基酸残基组成,分子质量4 kD左右;分子内有两亲性的 α -螺旋结构,半胱氨酸含量较少或不含有,不具有二硫键;N-端区域强碱性、带正电荷、亲水、C-端酰胺化、为中性疏水区;等电点为8.9~9.5;耐热,100℃加热仍保持较高的活性;不易被胰蛋白酶、胃蛋白酶水解。

1.2 富含半胱氨酸残基的抗菌肽类

insect defensin 是此类的代表。第一种 insect defensin 是由 Matsuyama 和 Natori^[4]于1988年在一种半翅目昆虫麻蝇(*Sarcophaga peregrina*)中发现的。此后,从各种昆虫中分离到大量 insect defensin,包括来自果蝇(*Drosophila melanogaster*)的 defensin 和来自麻蝇 *S. peregrina* 的 sapecin、sapecin B、sapecin C等^[5]。至今,昆虫纲中已有15大类30多种 insect defensin 被报道^[6]。insect defensin 对革兰氏阳性菌的抗菌活性较强,而对革兰氏阴性菌、真菌及真核细胞几乎无效,不引起血细胞溶血效应。insect defensin 由29~54个氨基酸残基组成,分子中含有6个保守的半胱氨酸残基,形成3个典型的分子内二硫键,呈三束 β 折叠结构;分子中也可形成两亲性 α -螺旋结构。

1.3 富含脯氨酸残基的抗菌肽类

这类抗菌肽是 Casteels 等^[7]于1989年从膜翅目的意大利蜂(*Apis mellifera*)血淋巴中首先发现的。目前已在双翅目、膜翅目、半翅目和鞘翅目等中发现。这类抗菌肽都由15~34个氨基酸残基组成,其中脯氨酸含量在25%以上,主要抑制革兰氏阴性菌,对革兰氏阳性菌无作用。富含脯氨酸的抗菌肽可以分为无取代基和有O-糖基化抗菌肽两类,两类高度同源,结构上的区别仅在于有O-糖基化抗菌肽有的苏氨酸的羟基上发生O-糖基化。Bulet 等^[8]的研究表明:不含取代基的抗菌肽的活性明显偏低,如果把原来带有取代基的抗菌肽分子中的取代基去掉,则其活性会明显下降。

1.4 富含甘氨酸残基的抗菌肽类

attacin 是此类的代表,包括来自天蚕 *H. cecropia* 的 attacin A-F,来自家蚕(*Bombyx mori*)的 attacin,来自麻蝇 *S. peregrina* 的 sarcotoxin IIA、sarcotoxin IA、sarcotoxin IB、sarcotoxin IC 和来自果蝇 *D. melanogaster* 的 attacin 等^[5]。1993年,Casteels 等^[9]从意大利蜂 *A. mellifera* 的血淋巴中分离到另一种富含 Gly(质量分数为19%)的抗菌肽,命名为膜翅肽(hymenoptaecin),由93个氨基酸残基组成,不含 Cys。这类抗菌肽一级结构中富含 Gly, Cys 含量很少或不含有,不能形成分子内二硫键,氨基酸残基上也不具有修饰基团,相对分子质量为8~30 kD,具广谱抗菌活性。有人推测这类抗菌肽中含量很高的 Gly 对提高肽链的弹性及广谱抗菌等可能起重要作用^[10]。

2 昆虫抗菌肽的作用机理

关于昆虫抗菌肽的抗菌机理,因内外学者对此研究已经很多,但至今仍然存在不同看法。目前一般认为抗菌肽通过静电作用与细菌细胞膜相结合,形成离子通道,造成细胞膜结构破坏,引起细胞内物质的大量渗出,最终导致细菌死亡。Christensen 等^[11]以脂双层为模型详细描述了抗菌肽的通道形成过程:抗菌肽分子通过其两亲 α -螺旋上的正电荷与细菌细胞质膜磷脂分子上的负电荷之间的静电吸引而结合在质膜上,接着抗菌肽分子中的疏水段借助于分子中的连接结构的柔性插入到质膜中,之后抗菌肽分子的两亲 α -螺旋也插入到质膜中,打乱了质膜上蛋白质和脂质原有的排列秩序,由于 α -螺旋是亲水和疏水两亲性的,所以最终通过膜内分子的相互位移使抗菌肽分子相互聚

集在一起形成离子通道,造成菌膜失去电势,胞内物质泄漏,不能保持正常的渗透压而死亡。Lockey 和 Ourth^[12] 通过电镜直接观察到抗菌肽在菌膜上造成孔洞,导致菌胞内容物泄漏,细菌死亡,为离子通道的形成提供了直接的证据。对于离子通道的形成,有科学家提出了不同的见解。Fink 等^[13] 认为,当抗菌肽作用于细胞膜时,N-端的两亲螺旋结合在膜表面,只有 C-端的疏水螺旋插入细胞膜中而形成离子通道。Clague 和 Cherry^[14] 则认为,抗菌肽通过作用于膜蛋白而引起蛋白质凝聚失活,使细胞膜变性而形成离子通道。Gazit 和 Lee^[15] 根据其通过衰减全反射傅立叶变换红外光谱和分子动态模拟手段得出的实验结果,对抗菌肽的作用机理提出了不同的见解,认为抗菌肽只是结合到了单位膜的表面,并未观察到抗菌肽插入膜中,更未形成通道。从而使抗菌肽的通道机理遇到了挑战。但无论如何,抗菌肽的作用靶位是细菌细胞质膜,作用结果是导致质膜的通透性增大等基本是确切无疑的。

另外,人们还发现昆虫抗菌肽可通过抑制细胞呼吸、抑制细胞外膜蛋白质的合成和抑制细胞壁的形成等机制来杀灭细菌。Fehlbaum 和 Bulet^[16] 对死亡素 thanatin (属防御素家族)的研究发现,thanatin 在 0.3 ~ 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 时就对大肠杆菌表现出强烈的杀菌作用,但当其浓度提高到 70 $\mu\text{mol/L}$ 时仍检测不到细胞内物质的泄漏,当用 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 thanatin 处理细菌 1 h 后,可监测到细菌的呼吸变弱;6 h 后,细菌的呼吸作用完全停止。由此推断 thanatin 是通过抑制细胞的呼吸作用来杀菌的。Carlsson 和 Bennich^[17] 研究发现,attacin 能够干扰大肠杆菌细胞外膜蛋白 OmpC、OmpF、OmpA 以及 LamB 基因的转录,使这些蛋白的含量减少,从而导致细胞膜的通透性增加,细菌的生长受到抑制。此外,抗菌肽还能刺激一些水解酶产生活性,干扰细菌 DNA 或蛋白质的稳定性,正离子肽还能结合到核酸并抑制其合成来破坏细菌的生长。

研究表明,有些昆虫抗菌肽还具有抗病毒活性。抗菌肽可能通过与病毒粒子结合,还可能通过抑制病毒的繁殖,也可能通过模拟病毒的侵染过程而起抗病毒作用^[18]。有些抗菌肽还能杀灭癌细胞,它们可能通过破坏癌细胞内微管的正常功能,断裂细胞骨架,破坏细胞器,断裂癌细胞染色体 DNA 从而杀伤癌细胞。

有意义的是,昆虫抗菌肽只对原核生物细胞和发生病变的真核细胞有杀伤作用,而对正常真核生物细胞却没有作用。原因可能在于原核生物与真核生物细胞的膜结构不同,后者细胞膜中含大量的胆固醇,而胆固醇的存在使细胞膜结构稳定,阻止抗菌肽的疏水端插入胞膜的磷脂双分子层。而且,高等动物细胞存在高度发达的细胞骨架系统,它的存在抵抗了抗菌肽的作用。另外还可能是高等动物细胞膜外表面的唾液酸与膜的距离有 8 nm,它可能与抗菌肽的带正电区结合而阻止其接近细胞膜发挥杀伤作用^[19]。

3 昆虫抗菌肽的基因工程

昆虫抗菌肽基因结构和基因调控的完善为昆虫抗菌肽基因工程的研究打下了基础。从昆虫血淋巴中提取抗菌肽不仅操作烦琐而且提取率很低,从而限制了抗菌肽的研究与应用。现代基因工程技术为获取抗菌肽提供了全新的途径。人们开始探讨通过基因工程技术手段生产抗菌肽、改造抗菌肽、设计新的抗菌肽、合成抗菌新药,并把抗菌肽基因转移到动植物体内以提高它们抵抗疾病的能力。

对昆虫抗菌肽基因结构的分析表明,它们是一种典型的真核基因,具有一个 CAAT 框,一个 TATA 框,一个特异的帽子位点和 polyA 加尾信号序列 AATAAAA,以及内含子和假基因^[20]。各种抗菌多肽是以前体的形式转录,在成熟肽前有一段信号肽和一段 2 ~ 35 个氨基酸残基的 Pro 序列^[21]。迄今为止,人们已经成功地构建了多种 cecropin 及其前体和 defensin 的 cDNA,典型的模式都是信号肽、肽前区、成熟抗菌肽、 α -酰胺前体。

多种昆虫抗菌肽已在不同的表达体系中得到表达。如天然抗菌肽 A、B 已在昆虫系统中得到表达;柞蚕抗菌肽 D、绿蝇抗菌肽在酵母系统中得到表达;天蚕抗菌肽 A 在真核系统中得到表达^[22]。1989 年,Jaynes 等^[23] 报道将修饰过的 cecropin B 基因以融合蛋白的方式在大肠杆菌中表达,并且高水平地发酵到 1 m^3 ,同时开展转基因动物的研究。Xie 等^[24] 根据已知家蚕 CMIV 的氨基酸序列,选用大肠杆菌偏爱的密码子,人工合成了家蚕抗菌肽 CMIV 基因,在大肠杆菌 HB101 中表达融合蛋白,切割裂解后获得具有较强抗菌活性并对肿瘤细胞 U937 和 K562 有抑杀作用的抗菌肽 CMIV。赵东红等^[25] 在 sf 21 细胞和甜菜夜蛾幼虫中表达了人

工合成的家蚕抗菌肽 CMIV 基因, 并均检测到抗菌活性。苏志坚等^[26]用天蚕素杂合肽基因与人酸性成纤维细胞生长因子构建融合基因重组质粒, 转化进酵母中进行表达, 表达产物既有抗菌肽的抑菌活性, 又有细胞生长因子的促愈合能力。

昆虫抗菌肽在植物基因工程中成绩喜人。Destenfino-Beltan 构建了 *shiva-1* 和 *cecropin B* 基因的植物表达载体, 并将 *shiva-1* 和 *cecropin B* 基因转入烟草和马铃薯, 结果转 *shiva-1* 基因的烟草青枯病发病延迟, 病情指数低下, 植株死亡率降低, 但 *cecropin B* 转基因烟草则未观察到青枯病的抗性有所增加, 原因可能是 *cecropin B* 被蛋白酶水解^[27]。2000 年, Sharma 等^[28]将 *cecropins B* 基因转入水稻, 利用稻谷壳质酶信号肽使 *cecropins B* 分泌到细胞间隙, 从而保护了目的肽免受细胞中肽酶的降解, 获得了抗病能力增强的水稻品系。张银东等^[29]将 *cecropin B*、*cecropin D* 基因导入辣椒, 获得再生植株。人们在菊花^[30]、毛白杨^[31]、番茄^[32]等农作物中也进行了抗菌肽转基因工作, 并取得了很大的进展。抗菌肽转基因植物的研究为将来获得抗病植株提供了广阔的前景。

昆虫抗菌肽转基因动物研究方面主要集中在提高动物的抗病能力和传染病防治。Reed 等^[33]将 *shiva-1 a* 基因转入小鼠中, 结果转基因鼠对布鲁氏杆菌抵抗力明显增加。Durvasula 等^[34]通过在长红猎蝽 (*Rhodnius prolixus*) 的共生菌中表达 *cecropin A*, 使感染昆虫的锥虫数量明显减少或消失。昆虫是很多人类疾病的传播媒介, 通过转基因构建一个新品系来中断传播途径的方法是克服人类传染病的一条新思路。

4 展望

近年来, 由于抗生素的广泛临床应用, 抗生素的耐药性和毒副作用已经引起了人们的极大关注, 发展新型抗生素日益重要。随着对昆虫抗菌肽的深入研究, 其独特的作用机制引起了人们的高度重视, 其相对分子质量小、对热稳定、水溶性好、抗菌谱广、不易使病原菌产生耐药性、只作用于原核细胞和病变真核细胞而对正常真核细胞无害的特点, 在当前抗生素的耐药性较为普遍, 开发一种新的抗生素又极其困难的情况下, 倍受人们青睐。随着新的抗菌肽的不断发现和对抗菌肽作用机理及基因表达调控机制认识的不断深化, 将有可能设计出一些具有抗肿瘤细胞、病毒、真菌和

高效抗细菌的新型抗菌肽, 为新药开发提供新途径, 为人类创造更大的价值。

参考文献 (References):

- [1] BOMAN H G, NILSSON-FAGE I, PAUL K, *et al.* Insect immunity, characteristics of an inducible cell free antibacterial reaction in haemolymph of *Samia cynihia* pupae[J]. *Infection and Immunity*, 1974, 10: 136-145.
- [2] KANOST M R, JIANG H, YU X Q. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca Sexta*[J]. *Immunol Rev*, 2004, 198: 97-105.
- [3] SCHNEIDER J J, UNHOLZER A, SCHALLER M, *et al.* Human defensins[J]. *J Mol Med*, 2005, 83 (8): 587-595.
- [4] MATSUYAMA K, NATORI S. Purification of three antibacterial proteins from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina*[J]. *J Biol Chem*, 1988, 263 (32): 17112-17116.
- [5] 梁永利. 天然抗菌肽的来源及分类 [J]. *安徽农业科学*, 2006, 34(18): 4728-4734.
- [6] 陈留存, 王金星. 昆虫抗菌肽研究现状[J]. *生物工程进展*, 1999, 19(3): 55-60.
- [7] CASTEELS P, AMPE C, JACOBS F, *et al.* Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees[J]. *EMBO J*, 1989, 8(8): 2387-2391.
- [8] BULET P, DIMARCQ J L, HETRU C, *et al.* A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-Glycosylated substitution[J]. *J Biochem*, 1993, 268: 14893-14897.
- [9] CASTEELS P, AMPE C, JACOBS F, *et al.* Functional and chemical characterization of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*) [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(10): 7044-7054.
- [10] MACKINTOSH J A, GOOLEY A A, KARUSO P H, *et al.* A gloverin-like antibacterial protein is synthesized in *Helicoverpa armigera* following bacterial challenge[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 1998, 22: 387-399.
- [11] CHRISTENSEN B, FINK J, MERRIFIED R B, *et al.* Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1988, 85: 5072-5076.
- [12] LOCKEY T D, OURTH D D. Formation of pores in *Escherichia coli* cell membranes by a cecropin isolated from hemolymph of *Heliothis vires* larva[J]. *Eur J Biochem*, 1996, 236(1): 263-271.
- [13] FINK J, BOMAN A, BOMAN H G, *et al.* Design, synthesis and antibacterial activity of cecropin-like model peptides[J]. *Int J Peptide Protein Res*, 1989, 33(6): 412-421.
- [14] CLAGUE M J, CHERRY R J. A comparative study of band 3 aggregation in erythrocyte membranes by melittin and other cationic agents[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1989, 980(1): 93-99.
- [15] GAZIT E, LEE W J. Mode of action of the antibacterial ce-

- crocinB2: a spectrofluorometric study[J]. *Biochemistry*, 1994, 33(35): 10681-10692.
- [16] FEHLBAUM P, BULET P. Structure activity analysis of thannatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1996, 93(3): 1221-1225.
- [17] CARLSSON A, BENNICH H. Attacin, an antibacterial protein from *Hyalophora cecropia*, inhibit synthesis of outer membrane proteins in *Escherichia coli* by interfering with omp gene transcription[J]. *Infect and Immunity*, 1991, 59: 3040-3044.
- [18] ANDREU D, RIVAS L. Animal antimicrobial peptides: an overview[J]. *Biopolymers*, 1998, 47: 415-433.
- [19] 陈琛, 王新华, 薄新文, 等. 抗菌肽及其在畜牧生产体系中的应用[J]. *饲料工业*, 2006, 27(7): 6-8.
- [20] LINDHOLM D A, GUDMUNDSSON G H. A highly repetitive, mariner-like element in the genome of *Hyalophora cecropia*[J]. *J of Biology Chemistre*, 1991, 266(18): 11518-11521.
- [21] HOFFMANN J A. Innate immunity of insect[J]. *Current Opinio in Immunology*, 1995, 7(1): 4-10.
- [22] 赵东红, 戴祝英, 周开亚. 昆虫抗菌肽的功能、作用机理与分子生物学研究最新进展 [J]. *生物工程进展*, 1999, 19(5): 14-18.
- [23] JAYNES J M, BURTON C A, BARR S B, *et al.* *In vitro* cytotoxic effect of novel lytic peptides on plasmodium falciparum and trypanosoma cruzi[J]. *FASEB J*, 1989, 2(12): 2878-2883.
- [24] XIE W, QIU Q, WU H, *et al.* Expression of cecropin CMIV fusion protein in *E. coli* under T7 promoter[J]. *Biochem Mol Biol Int*, 1996, 39(3): 487-492.
- [25] 赵东红, 戴祝英, 周开亚, 等. 中国家蚕抗菌肽人工合成类IV基因在甜菜夜蛾虫体中的表达[J]. *微生物学报*, 2001, 6(41): 680-685.
- [26] 苏志坚, 吴晓萍, 郑青, 等. 抗菌肽和人酸性成纤维细胞生长因子融合蛋白在毕赤酵母中的表达及其活性鉴定 [J]. *中国药科大学学报*, 2005, 36(1): 63-68.
- [27] DESTENFANO-BELTAN L. Plant gene research molecular approaches to crop improvement[M]. New York: Springer-verlay Wine, 1991. 17-32.
- [28] SHARMA A, SHARMA R, IMAMURA M, *et al.* Transgenic expression of cecropin B, an antibacterial peptide from *Bombyx mori*, confers enhanced resistance to bacterial leaf blight in rice[J]. *FEBS Lett*, 2000, 484 (1): 7-11.
- [29] 张银东, 唐跃东, 曾宪松. 抗菌肽基因转化辣椒的研究[J]. *华南热带农业大学学报*, 2000, 6 (1): 1-4.
- [30] 傅荣昭, 刘明, 梁红健, 等. 通过根癌农杆菌介导法获得菊花转基因植株[J]. *植物生理学报*, 1998, 24(1): 72-76.
- [31] 赵世民, 祖国诚, 刘根齐, 等. 通过根癌农杆菌介导法将免疫防御素-1 基因导入毛白杨 (*P. tomentosa*) [J]. *遗传学报*, 1999, 26(6): 711-714.
- [32] 田长恩, 王正询, 陈韬, 等. 抗菌肽 D 基因导入番茄及转基因植株的鉴定[J]. *遗传*, 2000, 22(2): 86-89.
- [33] REED W A, ELZER P H, ENRIGHT F M, *et al.* Interleukin 2 promoter/enhancer controlled expression of a synthetic cecropin-class lytic peptide in transgenic mice and subsequent resistance to *Brucella abortus*[J]. *Transgenic Res*, 1998, 6(5): 337-347.
- [34] DURVASULA R V, GUMBS A, PANACKAL A. *et al.* Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria[J]. *Pro of the National Acad of Sci of the USA*, 1997, 94(7): 3274-3278.