

短杆菌肽 S 的研究进展

高向阳^{1,2} 陈 念² 林壁润³ 姚汝华¹

- (1. 华南理工大学 食品科学与生物工程学院, 中国广东 广州 510640;
2. 华南农业大学 生命科学学院, 中国广东 广州 510642;
3. 广东省农科院 植物保护研究所, 中国广东 广州 510640)

摘要: 短杆菌肽 S 是迄今为止研究得最详细的一种与细胞膜发生相互作用的环状肽类抗生素。它的作用机理是破坏细胞膜结构, 导致细胞内含物的释放, 并最终引起细胞的死亡。对短杆菌肽 S 的研究进展进行了综述。

关键词: 短杆菌肽 S; 抗生素; 环肽

中图分类号: Q58

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2004)S0-0076-04

Progresses on the Studies of Gramicidin S

GAO Xiang-yang^{1,2}, CHEN Nian², LIN Bi-run³, YAO Ru-hua¹

- (1. College of Food and Biotechnology Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, Guangdong, China; 2. College of Life Science, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, Guangdong, China; 3. Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong, China)

Abstract: Gramicidin S is the most thoroughly studied cyclic peptide since now, its mechanism is destorying the structure of the membrane, inducing the leakage of the endocellular materials, and killing the microbial cells at last. Advances in the studies of Gramicidin S are reviewed.

Key words: Gramicidin S; antibiotics; cyclic peptide

(Life Science Research, 2004, 8(2): 076 ~ 079)

短杆菌肽 S (Gramicidin S, GS) 是 *Bacillus brevis* 分泌的由 10 个氨基酸组成的环状肽类抗生素, 它是在 1944 年从前苏联的一个农场的土壤中分离发现的, 其结构表示为 [Cyclo-(L-Val-L-Orn-L-Leu-D-Phe-L-Pro)₂]^[1, 2]. GS 在最初的时候由于被误认为是线性肽而错误命名为“Gramicidin”, 事实上它应该是短杆菌素 (Tyrothricin) 家族的成员. GS 具有很强的抗微生

物活性, 尤其对 G⁺ 菌和一些病原真菌都具有显著的杀伤作用. 但它作用的专一性较小, 具溶血细胞毒性和肝、肾的细胞毒性, 所以限制了其作为一种抗生素药物在医学临床方面的应用^[3].

人们已经进行了很多关于 GS 方面的研究, 特别在与膜的相互作用方面, GS 是目前研究得最详细的环状肽类抗生素. 将其研究进展进行综述, 对于其它的环肽类物质的研究具有重要的借

收稿日期 2004-04-22; 修回日期 2004-05-08

基金项目: 国家“863”计划项目(2001AA246015); 广东省自然科学基金团队项目(2KB042051); 国家自然科学基金资助项目(30271486); 广东省自然科学基金资助项目(032011).

作者简介: 高向阳(1966-), 女, 苗族, 湖南人, 副教授, 华南理工大学在职博士研究生, 主要从事生物化学及生物制药研究, Tel: +86-020-38675625, E-mail: gaogxy@yahoo.com.cn.

鉴和指导意义。

1 生物合成

在 1969 年,GS 的生物合成途径得以阐明,其生物合成机理不是由 tRNA 控制的专一性较高的核糖体合成,而是由排列在一起的多酶复合物决定的非核糖体合成^[4]。GS 的生物合成涉及到两个多功能蛋白 GS1 和 GS2 所组成的多功能酶复合物。GS1 激活 L-Phe 并通过巯基与之结合,然后将它转移到 GS2 的巯基上,同时将其构象从 L 型变为 D 型。两个激活的氨基酸结合在一起之后就起始了肽链的延伸反应,L-Pro、L-Val、L-Orn 和 L-Leu 依次通过同样的方式加入到肽链中形成单体的四肽。GS2 含有 4 个氨基酸以及至少 4 个 ATP 的结合位点,每催化一个肽键的形成会消耗一个分子的 ATP。最后,两个四肽产物首尾结合环化形成环状八肽,完成了 GS 整个生物合成的过程^[5]。

2 生物学效应

GS 对大多数 G⁺菌和一些病原真菌都具有显著的抑制和杀伤作用,但是对 G⁻菌的作用较小。关于其抗菌作用,HVIROO Y 等用 C¹⁴ 标记的 GS 处理 *B. Subtilis*、*S. aureus* 和 *E. coil* 后,发现它可以快速吸附到前两种对其敏感的菌株上面,并且吸附量在一定范围内随其浓度呈线性变化,在最小抑制浓度下,GS 覆盖了绝大部分细胞壁表面^[6]。另外,GS 虽然不容易吸附到完整的大肠杆菌细胞壁表面,但是对其原生质体的吸附却非常显著,这说明了 G⁻菌细胞壁的屏障作用对 GS 的吸附具有重要影响^[1]。GS 处理还可以抑制枯草杆菌蛋白质的合成和对葡萄糖的吸收作用^[7]。

研究还发现,GS 对枯草杆菌孢子的萌发和营养生长也有显著的抑制作用,GS 处理后的孢子在萌发后观察到明显的形态变化,同时孢子中 NADH 氧化酶的活性也受到明显地抑制^[7]。使用胶体金免疫电镜技术研究 GS 对枯草杆菌孢子的作用,显示出 GS 能够穿透孢子外被进入其核心区域^[8]。

3 作用机理

GS 的三维结构模型如图 1 所示。D-Phe-Pro 构成了其两侧的 β -转角,两个三肽序列 -Val-Orn-Leu- 形成牢固的反式平行的 β -片层结

构,Leu 和 Val 的氨基质子和羧基之间氢键的形成稳定了其分子的构象^[9]。GS 是同时具有极性和非极性表面的双亲结构:两个极性的、带正电荷的 Orn 的 $-(CH_2)_2-NH_3^+$ 侧链和两个 D-Phe 的苯环突出在分子的一个面;4 个 Leu 和 Val 的疏水侧链 $(-CH_2-CH-(CH_3)_2$ 和 $-CH-(CH_3)_2$) 伸出于分子的另一面,这种双亲结构对它的生物活性是非常必要的^[10]。许多研究还显示,在各种极性的有机溶剂、洗涤剂胶团和磷脂双层的环境中,甚至在一些能使蛋白质发生变性的高温条件下,GS 的构象都能够保持稳定,这同时说明它的这种双亲结构是非常稳定的。

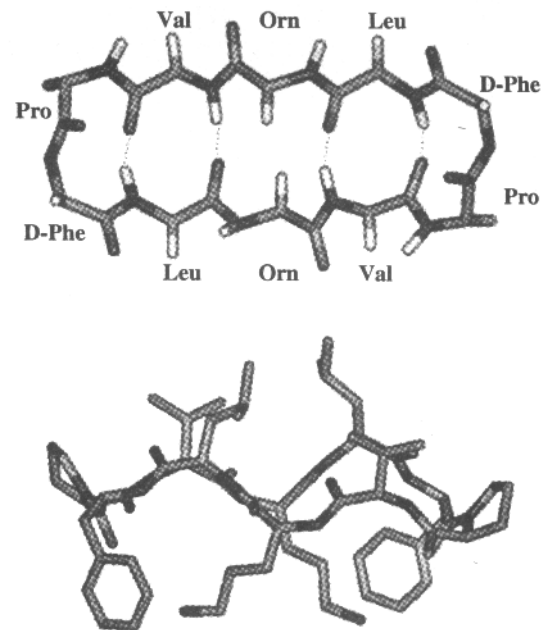


图 1 GS 分子结构及三维空间构象模型

Fig. 1 The molecular structure and the three dimensional model of GS

在用较低浓度的 GS 处理敏感菌株后,发现氮和磷等细胞内含物首先从细胞中释放出来,其释放的量与药物浓度呈正相关,从而推断 GS 可能与苯酚和一些表面活性剂具有相同的作用机理,即是通过与磷脂双层形成聚合物而破坏膜的结构,导致细胞内含物的释放而最终引起细胞的死亡^[6,11]。一些关于 GS 与人工脂质体、生物膜作用的生物物理学研究表明,GS 能强烈地分配进入到液晶态脂双层膜中,其精细的作用位点位于脂质双层磷脂分子的极性基头的表面区域,并与其发生静电相互作用,可以认为,疏水和静电相互作

用对此抗生素的活性有重要意义^[12]。

ELMAR J 等使用圆二色光谱和傅立叶变换红外光谱技术, 研究 GS 与磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺模型膜系统的相互作用表明, 胆固醇的加入会减弱 GS 与人工膜的相互作用^[13]。这一结果说明了为什么不含胆固醇的细菌细胞膜容易被破坏, 而含有胆固醇的真核细胞膜却不容易被破坏。

通过对前人所作的关于 GS 与膜作用的研究资料的总结, 我们认为, GS 对不同磷脂膜可能有不同的作用机理, 同时对于某一种特定的磷脂双层, 肽的浓度或者膜的状态都会对其相互作用产生影响, 所以还很难构建出一个详细的关于 GS 与膜作用的模型。但是, 利用 GS 对于不同膜脂的作用特点来合理的设计 GS 的类似物, 对提高它对病原菌的专一性具有重要意义。

4 构效关系

最初, 人们发现 GS 的环状结构对其活性是非常重要的, 线性化的 GS 的活性只有环状结构的十分之一, 而其同家族的类似物 Tryocidin A 在线性化后的活性则完全丧失。为了进一步研究它的一级结构和功能之间的关系, 早在 1957 年人们就已用化学法合成了 GS, 随后又对其氨基酸取代的衍生物进行了大量的研究, 包括使用各种光谱学的方法, 例如 CD 谱、X-Ray 和 NMR 等^[14, 15]。

人们对 GS 修饰的研究主要集中在对其 β - 折叠片层结构的修饰方面。研究发现, 这一区域氨基酸的疏水性、带阳离子电荷的残基的数目, 以及整个骨架的尺寸和结构等都对 GS 的杀菌效果有明显的影响^[16]。Orn 的 δ - 氨基对 GS 在膜上面的吸附和其抗微生物活性是非常重要的, KONDEJEWSKI L H 等用不同的中性和酸性氨基酸取代两个 Orn 残基后发现它的活性完全丧失; 用弱碱性的 His 取代 Orn 或者将其 δ - 氨基酰化, 活性则明显减少; 然而用强碱性的 Arg 或者 Lys 残基取代则没有减小其抗微生物活性。研究还发现, 人工合成的 [D-Orn-L-Leu]₄ 环状八肽对 *E. coil* 的活性比 GS 显著提高。这些都说明 GS 中碱性氨基酸的存在对其抗微生物活性是必要的。产生这些现象的原因可能是由于碱性氨基酸的疏水残基可以通过疏水键与带负电荷的膜牢固地结合^[7]。

另外, Leu 和 Val 的疏水性质对于其抗微生物活性来说也是非常必要的。用具有较小侧链的

脂肪族氨基酸取代 Leu 和 Val 会导致其抗微生物活性减弱; 用芳香族的 Phe 对其进行部分取代则轻微地减小其活性, 若用 Phe 全部取代这 4 个氨基酸则活性丧失非常大; 同样的, 用 Ala 或 Gly 取代其中任意两个都会使其活性显著的减小^[7, 8]。

D-Phe 对保持 GS 的 β - 片层结构具有独特的作用, 因为它参与了两个 β - 转角序列 (D-Phe-Pro) 的形成, 用其它氨基酸对其进行取代会使得这种片层结构变得不稳定, 从而减少其活性。相反, Pro 则可以被许多氨基酸取代而不减小它的活性, 这说明 Pro 的取代并未明显改变它的分子的构象^[3, 9]。

总之, GS 的这种双亲面状结构在肽类抗生素中非常具有代表性。我们认为, 对这类抗生素具有抗菌活性的必要特征, 可以归纳为以下 3 个方面: 1) 一个大的薄片状的柔性的环状结构; 2) 同时具有一个极性和非极性的表面; 3) 若干带正电荷的侧链基团伸出这个平面。正是以上这 3 种结构上的特征决定它们独特的抗菌机理, 这也为我们理性设计新的肽类抗生素分子提供了依据。

5 展望

人们对于设计和合成新的 GS 的类似物从而改变它的生物学活性一直有很大的兴趣。尽管当前还没有设计出一种临床上可以应用的基于 GS 的抗生素药物。但前人对 GS 的类似物的研究成果表明, 通过设计新的 GS 类似物从而提高其对病原微生物的活性和减少其细胞毒性作用, 从而制成可用于口服或注射用途的广谱抗生素药物应该是可行的^[17]。对其生物合成、生物学效应、作用机理和构效关系的研究, 都将加深人们对于环肽类抗微生物药物的认识, 也为进一步开辟新的环肽药物奠定基础。

参考文献 (References):

- [1] HIROO Y, KOJI O, KAZUHIKO T, *et al.* Mode of antibacterial action by Gramicidin S [J]. *J Biochem*, 1986, 100: 1253-1259.
- [2] GAUSE G F, BRAZHNKOVA M G. Gramicidin S and its use in the treatment of infected wounds [J]. *Nature*, 1944, 154: 703-709.
- [3] ELMAR J, PRENNER, RUTHVEN N A H, *et al.* The interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with the lipid bilayer model and biological membrane [J]. *Biochim et Biophys Acta*, 1999, 1462: 201-221.

- [4] 张致平. 微生物制药[M]. 北京: 化学工业出版社(ZHANG Z P. *Pharmaceutics of Microbial Medicine*[M]. Beijing: Chemical Engineering Press) 2002. 194-195.
- [5] KITTELBERGERL R, PAVELA-VRANCIC M, VON D H. Active site titration of gramicidin S synthetase 2: evidence for misactivation and editing in non-ribosomal peptide biosynthesis [J]. *FEBS Letters*, 1999, 461: 145-148.
- [6] HIROO Y, MAKOTO K, NAOTOMO T, *et al.* Absorption of ¹⁴C-labeled Gramicidin S on cell of Bacteria [J]. *J Biochem*, 1981, 90: 1087-1091.
- [7] KONDEJEWSKI L H, FARMER S W, WISHART D, *et al.* Modulation of structure and Antibacterial and Hemolytic activity by ring size in cyclic Gramicidin S analogs[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 25261-25268.
- [8] YASUSUKE T, YUKO I, YOKO Y, *et al.* Permeability of dormant spores of *Bacillus subtilis* to Gramicidin S[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1996, 136: 151-156.
- [9] YAMADA K, UNNO M, KOBAYASHI K, *et al.* Stereochemistry of protected ornithine side chains of Gramicidin S derivatives: X-ray crystal structure of the Bis-Boc-tetra-N-methyl derivative of Gramicidin S[J]. *J Am Chem Soc*, 2002, 124: 12684-12692.
- [10] GIBBS A C, BJORND AHL T C, HODGES R S, *et al.* Probing the structural determinants of type II' β -turn formation in peptides and proteins[J]. *J Am Chem Soc*, 2002, 124: 1203-1210.
- [11] BULENT G A, MUHAMMED G, FERDIE S. Thermodynamics study of gramicidin S and dipalmitoylphosphatidylcholine model membrane interactions based on the FTIR spectroscopy[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2001, 565: 281-286.
- [12] GIJSBERT M, GROTENBREG, EMILE S. Synthesis and biological evaluation of novel turn-modified gramicidin S analogues[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2003, 11: 2835-2841.
- [13] ELMAR J P, RUTHVEN N A H, LEWIS. Differential scanning calorimetric study of the effect of the antimicrobial peptide gramicidin S on the thermotropic phase behavior of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol lipid bilayer membranes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1510: 83-92.
- [14] SCHWYZER R, SIEBER P. Die synthese von Gramicidin S [J]. *Helv Chem Acta*, 1957, 40: 624-626.
- [15] MITSUNOBU D, SAORI F, YOSHIO K. Antiparallel pleated-sheets observed in crystal structures of N, N-Bis(trichloroacetyl) and N, N-Bis(m-bromobenzoyl) gramicidin S [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2001, 395(1): 85-93.
- [16] JELOKHANI-NIARAKI M, KONDEJEWSKI L H, FARMER S W, *et al.* Diastereoisomeric analogues of Gramicidin S: structure, biological activity and interaction with lipid bilayers [J]. *Biochem J*, 2000, 349: 747-752.
- [17] KONDEJEWSKI L H, LEE D L, JELOKHANI-NIARAKI M, *et al.* Optimization of microbial specificity in cyclic peptides by modulation of hydrophobicity within a defined structural framework [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 67-72.