

# 昆虫抗菌物质研究进展

翟朝阳

(华西医科大学医学分子生物学研究室 成都 610044)

昆虫是自然界中种类和数量繁多,生长繁殖迅速的一类动物。做为在自然界中长期生存的生物,各种昆虫在适应环境与环境的变化上各有其独特的方式,构成一幅丰富多彩,令人惊叹的画卷,而在抵御细菌和其他微生物的侵染上,却有很相似的地方,即都能迅速产生抗菌活性蛋白类的物质。这类物质存在于昆虫的血淋巴,是昆虫一种重要的防卫机能。昆虫抗菌物质具有可诱导性。除此之外,在许多方面类似于哺乳动物的免疫球蛋白。目前对昆虫抗菌物质的研究已成为一些实验室的目标。本文对这方面的研究进展作一综述,以期引起同行的兴趣和注意。

## 1 昆虫抗菌物质的诱导产生

哺乳动物对外来感染的应答,是产生免疫反应。与此相似的是,昆虫对外界微生物的感染,也能产生抗御性物质,包括抗菌蛋白或抗菌肽、溶菌酶或其他一些具有溶菌或抗菌活性的物质。这些物质因昆虫或来源的不同而有不同的名称,但均具有抗菌活性。这些物质存在于昆虫的血淋巴,通过提取血淋巴就可以分离获得。昆虫抗菌物质的产生或合成,是外界因素诱导作用下发生的生物效应。在可诱导的因素中,既可以用致病性细菌直接感染,也可以是一些不造成感染的物理或化学的因素,例如超声波、射线、生理盐水,聚肌胞核苷(poly I:C)等。屈贤铭等<sup>[1]</sup>用超声波处理家蚕 *Bombyx mori*、蓖麻蚕 *Philosamia cynthia ricina* 或柞蚕 *Antheraea pernyi*, 或直接用大肠杆菌 *Escherichia coli* 注射,均可诱导这些昆虫产生抗菌物质。电泳的结果表明,同一种蚕蛹经不同诱导源处理后形成相同的抗菌物质,而不同种属被诱导产生的抗菌物质则有明显的差异。龚琪等<sup>[2]</sup>用<sup>60</sup>Co $\gamma$ 射线、活的大肠杆菌及热灭活的金黄葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa* 和生理盐水作诱导源,诱导美洲大蠊 *Periplaneta americana* 的结果表明,不同诱导源诱导下产生的抗菌物质的活性大小有所不同,达到最大活性的时间亦不同,更重要的是,在抗菌特性上也有一些差异。刘玉滨等<sup>[3]</sup>用柞蚕和蓖麻蚕的蛹,棕色鳃角金龟 *Holotrichia titanis*、铜绿丽金龟 *Anomala corpulenta* 和苹毛丽金龟 *Proagopertha lucidula* 的幼虫(后三种属鞘翅目)做试验,经小白鼠肝癌细胞、大肠杆菌或巨大芽胞杆菌分别诱导,均获得成功。除以上种类的昆虫外,在大头金蝇 *Chrysomya megacephala*<sup>[4]</sup>、家蝇 *Musca domestica*<sup>[5]</sup>、麻蝇 *Sarcophaga peregrina*<sup>[6]</sup>、果蝇 *Drosophila melanogaster*<sup>[7]</sup>、蜜蜂 *Apis mellifera*<sup>[8]</sup>、

烟草天蛾 *Manduca sexta*<sup>[9]</sup>、及粉蚬 *Zephobas atratus*<sup>[10]</sup> 上都诱导出抗菌物质。由此可见。在外界诱导源的刺激下产生抗菌物质是昆虫类生物一个共同的普遍的特性，并非某一类昆虫所独有。但诱导源却是可以有所不同的。表 1 列出了各种不同的诱导源及所诱导的昆虫。从诱导源的不专一性可以推测，在控制昆虫抗菌物质基因的表达上似乎是在接受了第一信使的刺激后，有一个共同的第二信使，由它把诱导源刺激的次级效应传递给细胞核内的染色体上，从而引起抗菌物质基因的激活、启动和表达。由于昆虫对诱导源不能区分，诱导源没有专一性，这反映出昆虫在进化上还处于较低级的地位，但也可以理解为昆虫对自然界复杂环境的适应性和应激能力，或统称为昆虫的防卫机能。从性质上讲，这些抗菌蛋白是没有特异性的，非常相似于高等生物体内的某些生物活性因子。另一方面，高等生物至今也还保留着这种对外界因素刺激而产生生物活性因子的能力，例如干扰素，白细胞介素 2 都是如此。昆虫抗菌蛋白基因的可诱导性，正引起人们的广泛兴趣，因为它提供了一种研究基因选择性表达和调控机理的理想模式。

表 1 可诱导昆虫产生抗菌物质的诱导源和所诱导的昆虫

诱 导 源	供 试 昆 虫
大肠杆菌	家蚕
绿脓杆菌	蓖麻蚕
金黄葡萄球菌	柞蚕
巨大芽孢杆菌	果蝇
poly I : C	家蝇
2', 5' - 寡腺苷酸	绿蝇
小鼠肝癌细胞	蜜蜂
超声波	粉蚬
<sup>60</sup> Co γ 射线	棕色鳃角金龟
生理盐水	铜绿丽金龟
	苹毛丽金龟
	美洲大蠊

注：本表仅列出一部分诱导源和一部分试验昆虫，以此表说明产生抗菌蛋白是昆虫普遍具有的性质以及诱导源的不专一性

## 2 昆虫抗菌物质的性质

昆虫对外来细菌的感染，可产生具有抗菌活性的血淋巴蛋白，这是昆虫免疫中最重要的一种反应。从这个意义上理解，昆虫免疫反应与哺乳动物的特异性免疫反应有类似或相同的性质。例如，它们都需要有外界微生物的侵染来诱导产生，免疫反应的产物都具有针对侵染物的抗菌活性等。但另一方面，昆虫免疫又具有不同于哺乳动物特异性免疫反应的一些特点。这主要表现在两个方面，一是诱导昆虫免疫蛋白或抗菌蛋白合成的诱导源具有不专一性，这一点已如前述。二是合成的抗菌蛋白具有广谱抗菌活性。这一点又使昆虫免疫很象哺乳动物的非特异性免疫反应。或者说，昆虫抗菌蛋白兼有哺乳动物特异性和非特异性免疫的一些特征。

迄今为止对昆虫抗菌物质的分离和测定工作已经可以使我们对这类物质的性质有较

为清楚的了解。虽然可以将这类物质统称为抗菌蛋白/肽，但无论是从分子量大小，还是从有关蛋白质的其他特征(如结构、等电点等)来看，都存在一些差异。昆虫种类不同，其抗菌物质亦有所不同，这是显而易见的。尽管昆虫的种类和昆虫产生的抗菌物质都较多，然而仔细比较可以发现，某些种类的抗菌物质其实是很相似的。例如，双翅目果蝇中有三个表达免疫蛋白的基因<sup>[7]</sup>，称为 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、B。这三个基因的转录物都很小，大约长为 350 个核苷酸。研究结果表明，A<sub>1</sub> 与 A<sub>2</sub> 不仅非常相似，而且与麻蝇的麻蝇毒素 I 的序列相似，而后者又与鳞翅目的惜古比天蚕 *Hyalophora cecropia* 所产生的主要抗菌蛋白天蚕素(cecropin)属同一类抗菌蛋白。不同种类的昆虫之间在抗菌物质上的相似或相同，究竟在进化、生态和生活环境上有什么意义，目前还不能做出结论。顺便需要提及的是，对昆虫抗菌蛋白的命名，还没有统一的规定，一般是根据其来源而命名的。

顾名思义，抗菌蛋白具有抗菌的性质，这是昆虫抗菌物质普遍具有的共性。然而当用不同的致病菌作抑菌试验时发现，在抗菌谱、抑菌能力等特性上不同来源的抗菌蛋白又有所不同。根据对革兰氏阳性菌和阴性菌的抑制能力来划分，昆虫的抗菌物质大致可以分为四类(表 2)。一类是对革兰氏阳性菌有抑制作用的；一类是对革兰氏阴性菌有抑制作用的；第三类是对革兰氏阳性菌和阴性菌都有抑制作用的；对细菌的作用不是直接杀伤的归入第四类。值得注意的是，尽管抑菌的能力或者说性质上可以有一类和二类的区别，但往往是昆虫经诱导后，可以产生不止一类的抗菌物质，这就使昆虫对革兰氏阳性菌和阴性菌都具有抑制的能力。例如绿蝇经诱导产生的昆虫防御素<sup>[11]</sup>(insect defensins)和双翅肽<sup>[12]</sup>(dipteracins)，就分别对革兰氏阳性菌和阴性菌有抑制作用。粉蚬经诱导而合成的 B 肽、C 肽及鞘翅肽(coleopteracin)也是如此。

表 2 昆虫抗菌物质大致分类

类别	抑菌范围	举例
I	革兰氏阳性菌	天蚕溶菌酶 绿蝇防御素(defensins) 粉蚬 B 肽、C 肽等
II	革兰氏阴性菌	天蚕 attacins 绿蝇双翅肽(dipteracins) 蜜蜂的蜜蜂肽(apidaecins) 粉蚬鞘翅肽(colepteracin)等
III	革兰氏阳性菌 和阴性菌	天蚕素(cecropins) 蜜蜂 abaecin 麻蝇的麻蝇毒素 I 等
IV	(对细菌无直接抑制作用)	天蚕的 hemolin 等

注：本表是根据昆虫抗菌物质的抑菌范围进行分类的，与其他分类方法不相同

一个饶有兴趣的问题是，昆虫抗菌蛋白究竟有无抗病毒作用。和自然界的植物、哺乳动物等其他生物一样，昆虫也受到昆虫病毒的感染。昆虫既然对细菌乃至其他一些非特异性因素的刺激可以产生保护性的抗菌物质，那么对病毒的感染是否也同样能产生相

同的反应？换句话说，昆虫的抗菌蛋白是否具有抗病毒的能力？钟文彪等<sup>[13]</sup>曾报道，添食或注射聚肌胞核苷酸 (poly I:C) 或注射 2',5' - 寡腺苷酸 (2',5' - P<sub>3</sub>A<sub>3</sub>) 可以提高家蚕对引起家蚕中肠型脓病的病原体多角体病毒 (CPV) 的抵抗力，使家蚕的发病指数降低 40% ~ 50%。由于经 poly I:C 诱导后的家蚕中分离出至少三条新的蛋白质区带，作者推测，这些蛋白质与家蚕抗病毒活性有关。这显然是一项令人鼓舞的实验结果。然而要确切了解抗菌蛋白对病毒的作用及作用的机理、强弱等，还需要做更多更细的研究。目前有关昆虫抗菌物质的抗病毒能力方面的研究报道还不多<sup>[14]</sup>，没有可能对这一问题做出普遍意义的结论。但是，以病毒作为诱导源显然是可行的。因而抗菌蛋白的抗病毒潜能，是一个值得深入探索的课题。推而广之，抗菌蛋白对其他致病微生物如真菌，似乎也有抑制的作用或效果。无疑，这些信息和进一步的研究，对正在走向商品化的昆虫抗菌物质，会起到积极的作用，使这一生物资源的应用前景变得光明。

### 3 对昆虫抗菌物质的基因的认识

80 年代后期，昆虫抗菌蛋白的基因或 cDNA 陆续被克隆和分离出来，使得对抗菌蛋白的性质和特征的认识向前迈进了一步，其中最重要的是以鳞翅目的惜古比天蚕及双翅目的果蝇为代表的抗菌蛋白的基因或 cDNA。有关基因的结构与组织方面可以参阅翟启慧的综述<sup>[15]</sup>，此处想仅就抗菌蛋白基因在进化上的问题做一讨论。

鳞翅目的惜古比天蚕在受诱导源诱导后，产生多达 9 种有抗菌或免疫作用的蛋白类物质。其中最主要的抗菌蛋白是天蚕素 (cecropins)。天蚕素的类似结构，在其他种类的昆虫如果蝇中，也已找到或发现。而惜古比天蚕的天蚕素有 A、B、D 三类，它们对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有抑制作用。除了天蚕素以外，在 9 种抗菌或免疫类蛋白质中，还有 attacins 及溶菌酶对细菌也有直接杀伤作用。值得注意的是，尽管有了这些有效的杀菌物质，天蚕还能产生一种称为 hemolin 的物质，它不仅比昆虫类其他的抗菌蛋白都要大得多，而且本身并无直接抑制细菌的作用，而只是与细菌的膜相结合。从作用上看，更象是一种受体类物质。从 hemolin 的 cDNA 获得的蛋白质顺序和结构的分析<sup>[16]</sup>表明，它含有四个重复的免疫球蛋白样的区段，每个由 90 ~ 110 氨基酸组成，并且在同源的位置处都含有两个半胱氨酸残基。除了这两个半胱氨酸残基外，其他许多氨基酸残基也都是保守的，尤其是在上述两个半胱氨酸残基附近的一些氨基酸。在 Ig 家族的其他成员中，如小鼠神经细胞粘连分子 (NCAM)、人 K 轻链可变区 (Ig V<sub>K</sub>) 和小鼠 K 轻链恒定区。hemolin 核酸序列中存在大量的 β 重叠，这也是典型的 Ig 类区段的结构。此外，hemolin 还含有一个典型的真核细胞信号肽而缺乏穿膜的序列 (这一点与它是可溶性并释放到血淋巴中的发现相吻合)。以上结果表明，hemolin 属于 Ig 家族。高等生物的免疫系统也许就是从这种最初的血淋蛋白一步步发展进化来的。从这个意义上讲，惜古比天蚕显然要比不具有此序列结构的其他昆虫在进化地位上要高等得多。

高等生物与低等生物之间在某些基因的结构上有相似或相同之处，这是一个可以理解而且已经证明的事实。这种相同或相似，不仅可存在于基因内，而且也可存在于基因的旁侧序列，对基因的表达起着调控的作用。从进化的角度来看，越是高等的生物，其

调控机理越复杂，分工越精细。而低等生物的调控机理比较粗略。从果蝇的天蚕素基因位点的分析来看，可以找到这方面的一些线索或证据。在该位点内有三个基因和两个假基因呈紧密排列的结构。这样的结构不仅节约了空间，而且使这三个基因对外界诱导物的诱导采取了一种协同作用的方式，这显然是一种提高效率的办法。注射细菌后 1h，蚕体内即有大量 mRNA 积蓄，6h 内达到峰值。这样密集的基因排列，很可能是共用一个调节单元，而不象是三个基因各有独立的调节单元。

在介绍昆虫抗菌蛋白的同时，不能不提到，在高等生物体内也发现了小分子的抗菌肽。这种抗菌肽的大小、序列和结构，与昆虫的抗菌蛋白有很大相似性或同源性。高等生物体内发现的与昆虫抗菌蛋白相似的抗菌肽，是否是一种进化上的痕迹，它在高等生物的免疫反应中起什么样的作用，它的产生（诱导方式）是否也与昆虫相同，它的表达调控与昆虫相比有什么区别，以及它在高等生物体内与其他特异或非特异的免疫反应有什么协同作用等等，都是值得探索的问题。这些问题的阐明，将使我们的抗菌蛋白、昆虫、进化、生存等等一系列生物与自然界的有一个更深入和清晰的了解。此外，表达抗菌蛋白基因已获得成功<sup>[17]</sup>，它将推动昆虫资源的利用和为人类服务。

#### 4 小结

以上对昆虫抗菌物质的研究进展，从诱导产生到基因的结构作了粗略的介绍。昆虫抗菌物质最重要的特征就是能抑制细菌生长，由于其分子量较小，且抗菌谱宽，抑菌效率较高，这就给其带来了潜在的商用价值。国外采用分子生物学技术表达抗菌蛋白基因，解决了饲养繁殖昆虫占用空间和消耗饲料的一些问题，国内一些研究机构也在朝这个方向努力。期望本篇介绍能起到开拓眼界，引起兴趣的作用。

### 参 考 文 献

- 1 屈贤铭，祁国荣，黄自然. 注射大肠杆菌或超声波诱导家蚕及蓖麻蚕产生抗菌物质的比较研究. 昆虫学报, 1984, 27 (3): 275 ~ 279
- 2 龚琪，孟阳春，周洪福. 不同诱导源诱导美洲大蠊血淋巴抗菌物质的研究. 中国媒介生物学及控制杂志, 1993, 4 (2): 81 ~ 84
- 3 刘玉滨，王宗舜，杨明华. 几种昆虫的免疫试验研究. 动物学集刊, 1992, 9: 49 ~ 53
- 4 王晓东，靳庆生. 大头金蝇幼虫免疫系统对大肠杆菌诱导的应答研究. 昆虫知识, 1991, 28 (1): 40 ~ 42
- 5 王远程，刘伟，杨峰等. 家蝇血淋巴的提取及抗菌物质的诱导. 微生物学报, 1992, 32: (6): 439 ~ 444
- 6 Matsuyama K, Natori S. Purification of three antibacterial proteins from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga*. J. Biol. Chem. 1988a, 263: 17112 ~ 17116
- 7 Kylsten P, Samakovlis C, Hultmark D. The cecropin locus in *Drosophila*, a compact gene cluster involved in the response to infection. EMBO J. 1990, 9 (1): 217 ~ 224
- 8 Casteels P, Ampe C, Riviere, L *et al.* Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). Eur. J. Biochem. 1990. 187: 381 ~ 386
- 9 Nagy L M *et al.* Analysis of segmentation in the lepidopteran, *Manduca sexta*. in: Hagedorn H H, *et al.* (eds). Molecular Insect Science. New York: Plenum Press, 1990, 340
- 10 Bulet P, Cociancich S, Dimarcq J-L *et al.* Isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of a new member of the insect defensin family. J. Biol. Chem. 1991, 266: 24520 ~ 24525

- 11 Lambert J, Keppi E, Dimarcq J-L *et al.* Insect immunity: Isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranovae* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989, **86**: 262 ~ 266
- 12 Dimarcq J-L, Keppi E, Dunbar B *et al.* Insect immunity: Purification and characterization of a family of novel inducible antibacterial proteins from immunized of the dipteran *Phormia terranovae* and complete amino-acid sequenc of the predominant member, diptericin A. *Eur. J. Biochem.* 1988, **171**: 17 ~ 22
- 13 钟文彪, 黄自然, 卢蕴良等. 聚肌胞核苷酸及2', 5' - 寡腺苷酸诱导家蚕对细胞质多角体病毒抑制作用的研究. *科学通报*, 1982, **12**: 761 ~ 763
- 14 Daher K A, Selsted M E, Lehrer R I. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J. Virol.* 1986, **60** (3): 1068 ~ 1074
- 15 翟启慧. 昆虫分子生物学的一些进展: 胚胎发育、丝蛋白与可诱导的抗菌蛋白. *昆虫学报*, 1993, **36** (2): 231 ~ 246
- 16 Sun S-C, Lindstrom I, Boman H G *et al.* Hemolin: An insect immune protein belonging to the immunoglobulin superfamily. *Science*, 1990, **250**: 1729 ~ 1732
- 17 Dimarcq J-L, Zachary D, Hoffmann J A *et al.* Insect immunity: expression of the two major inducible antibacterial peptide, defensin and diptericin, in *Phormia terranovae*. *EMBO J.* 1990. **9**: 2507 ~ 2515

## THE PROGRESS OF STUDIES ON INSECT ANTIBACTERIAL PROTEINS

Zhai Chaoyang

(Laboratory of Molecular Biology, West China University of  
Medical Sciences Chengdu 610041)

**Abstract** Insect immune response to bacterial infection results in the synthesis of antibacterial proteins in its hemolymph. This paper reviews the recent progress in this field, concentrating on the characterization of the antibacterial proteins and the potential significance of these proteins. The most potent character of the inducible antibacterial proteins is that they have the capacity to identify foreign objects, to attack them and protect the insect itself from being injured. Other progresses related to the nature of these proteins, such as their molecular biology, are also mentioned.