

蚕类抗菌肽的研究现状

范涛, 王储炎*, 吴传华, 代君君, 肖林珍, 田善富, 周业文, 范后文 (1. 安徽农业科学院蚕桑研究所, 安徽合肥230061; 2. 安徽合肥永丰畜禽有限公司, 安徽合肥231200)

摘要 主要就蚕类抗菌肽的分子结构、理化性质、药理功能及其在工业中的应用进行综述。

关键词 蚕; 抗菌肽; 结构; 药理功能; 应用

中图分类号 S881 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)01-00194-02

Study Actuality of Antimicrobial Peptides from Silkworm

FAN Tao et al (Sericultural Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Science, Hfei, Anhui 230061)

Abstract The molecules structure, physical and chemical properties, physiological functions and application in industry were introduced.

Key words Silkworm; Antimicrobial peptides; Structure; Physiological function; Application

抗菌肽 (AMPs) 作为生物体抵御外源微生物入侵的第一道防线, 广泛存在于各类群的动物体内。1972 年, 瑞典科学家 Boman 等首先在果蝇中发现抗菌肽, 并证明其具有免疫功能。随后, 大量抗菌肽被相继发现、分离、纯化。迄今为止, 从昆虫、鱼类、两栖类、海洋无脊椎动物、哺乳类中发现的抗菌肽已达 750 种以上^[1]。目前, 抗菌肽可大致分为 4 类^[2]: 天蚕素 (cecropin) 类; 富含 pro 残基的蛙皮素 (magainin) 类; 富含甘氨酸 (Gly) 残基的蜂毒素 (melitin) 类; 富含半胱氨酸 (Cys) 残基的防御素 (defensin)。这些抗菌肽不仅具有广谱的抗菌能力, 而且对真菌、病毒和癌细胞也有抵抗作用。人们期望通过研究, 一方面在分子水平上弄清抗菌肽的合成过程及其调控机制; 另一方面, 想通过探讨抗菌肽的药用开发价值, 努力使之成为新型抗菌药物, 从而为解决细菌对抗生素日益增强的耐药性这一棘手问题提供新途径^[3]。因此, 有关抗菌肽及其应用逐渐成为动物学、植物学、药学及生理学领域的研究热点。

蚕类抗菌肽是存在于家蚕及蚕蛹的血淋巴内具有抗菌活性的多肽物质, 在蚕的天然免疫中起到至关重要的作用。它对外源病原菌的抑制作用, 降低了蚕自身的致病性, 增强了蚕的天然免疫能力。1981 年, 瑞典科学家 Steiner 等用 *E. coli* 诱导惜古比天蚕蛾 (*Hyalophora cecropia*) 时, 分离得到 1 种杀菌肽, 并将其命名为 cecropin^[4]。同年, 我国学者黄自然等首先从中国柞蚕 (*Chinese Antheraea pernyi*) 中分离到抗菌肽及溶菌酶^[5]。随后, 蚕类抗菌肽才相继被分离、纯化, 并且其氨基酸一级结构和基因序列得到确定。为此, 笔者仅以蚕类抗菌肽为主, 对其结构性质、药理功能、制备方法、应用前景进行综述。

1 结构

目前, 从蚕类分离、纯化, 已经确定的抗菌肽主要分为 2 大类, 即 cecropin 类和富含 Gly 残基的 melitin 类。

1.1 Cecropin 类 Cecropin 类抗菌肽, 其英文名称为天蚕素。1981 年, 科学家首次从家蚕中发现的抗菌肽为天蚕素。随后, 我国学者黄自然等、张双全等、郭华容等和日本学者 Mrishina 等都先后从蚕或蚕蛹中分离出此类抗菌肽, 测出其碱

基序列, 并推导出其氨基酸组成^{5-8]}。

目前, 这类抗菌肽的基本结构已较明确, 由 31~39 个氨基酸残基组成, 分子量约为 4 kD, 含较少的 Cys, 不能形成分子内的二硫键, 有强碱性的 N 端和强疏水性的 C 端, C 末端酰胺化。在肽的许多特定位置有较保守的残基, 如 2 位上的色氨酸, 5、8 和 9 位有 1 个或 2 个赖氨酸 (Lys), 11 位是天冬氨酸 (Asn), 12 位是精氨酸 (Arg)。有些位置尽管残基不同, 但仍为保守替换^[9]。对抗菌肽二级结构的理论预测和 CD 谱及二维核磁共振数据表明, 其分子结构含有 2 个 α -螺旋, 螺旋间由 Ala-Gly-Pro 组成的铰链连接, 其中 N 端的 α -螺旋具有两亲性, C 端的 α -螺旋疏水性很强。这样的结构特点对保持高抗菌活性具有特殊的重要性^[10], 而酰胺化的 C 端则对其广谱作用极为重要^[11]。

1.2 富含甘氨酸的抗菌肽 (glycine rich peptides) 此类抗菌肽又称为蜂毒素 (melitin), 因其最早是从蜜蜂毒液中发现而得名。1984 年, Kochm 等自免疫惜古比天蚕蛾血淋巴中分离获得柞蚕素。1991 年, A. Carlsson 等从天蚕中分离出 6 种 attin, 其中 4 种呈碱性, 2 种呈中性或微酸性^[12]。之后, 在家蚕和果蝇中也同样分离获得了柞蚕素, 并构建了编码二者柞蚕素前体蛋白 cDNA。

这类抗菌肽的共同特点是富含甘氨酸, 有些是全序中富含甘氨酸, 有些则是某一结构域富含甘氨酸, 不含或含很少的半胱氨酸, 不能形成分子内的二硫键, 氨基酸残基上不具有修饰基团, 分子量为 20~27 kD。通常这类抗菌肽均在 N 端有 1 个富含脯氨酸的 P 结构域, C 端有 1 个富含甘氨酸的 G 结构域。P 和 G 2 种结构域的存在可能与其广谱抗菌作用有关^[13]。由于其具有较强的溶血作用而限制了其作为抗菌物质的使用。

2 性质

蚕类抗菌肽水溶性好, 热稳定性强, 在 100℃ 下加热 10~15 min 仍能保持其活性。新疆家蚕抗菌肽在 100℃ 下加热 8 h, 抗菌活力仍然保持不变^[14]。此外, 蚕类抗菌肽呈碱性, 其等电点大于 7, 表现出较强的阳离子特征, 而且其对较强的离子强度和较低或较高的 pH 值都有一定的抗性作用。另外, 部分抗菌肽尚有抵抗胰蛋白酶和胃蛋白酶水解的能力^[15]。

3 药理功能

3.1 抗菌 蚕类抗菌肽对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均

基金项目 合肥市应用技术与开发项目(编号:合科合同(农)字 2008(1005)号)。

作者简介 范涛(1962-), 男, 安徽太和人, 研究员, 从事桑蚕资源综合利用方面的研究。* 通讯作者。

收稿日期 2008-10-28

有较强的杀灭作用,尤其对耐药菌株有很明显的抑杀作用,对一些农作物和经济作物的病原菌也有同样的效果。黄自然等的研究表明,柞蚕抗菌肽对约40多种细菌有明显的杀灭效果,对绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及副伤寒菌耐药菌株都有很强的杀菌作用^[5,16]。

3.2 抗病毒 研究表明,蚕类抗菌肽对DNA、RNA病毒有很强的抵抗作用。Cecropin类和Mittin类抗菌肽在亚毒性浓度下通过阻遏基因表达来抑制HV-1病毒的增殖。Wächinger等报道天蚕素能抑制艾滋病病毒。华南农业大学研制的蚕抗菌肽AD对鸭乙型肝炎DNA增殖有抑制作用^[17]。

3.3 抗寄生虫^[9] 试验证明,蚕类抗菌肽可以杀死草履虫、变形虫、四膜虫。柞蚕抗菌肽还对阴道毛滴虫有杀伤作用。Dza Achica等发现一种合成的天然素-蜂毒素杂合体对莱什曼原鞭毛虫有损伤作用。

3.4 抗肿瘤 抗菌肽能显著性地抑制某些肿瘤细胞的生长,对肿瘤细胞有选择性的杀伤作用。戴祝英等研究表明,家蚕抗菌肽及其免疫血淋巴对B₄转化细胞有明显的杀伤作用,能明显地抑制肿瘤细胞的生长^[18]。贾红武等从家蚕蛹血淋巴中分离纯化的抗菌肽组分对体外培养的癌细胞株U937(巨噬细胞淋巴瘤)、K562(人髓样白血病细胞)、S180(肉瘤细胞)、Hep-2(喉癌细胞)和Hla(宫颈癌细胞)有明显的选择性杀伤作用^[19]。张卫民等报道,柞蚕抗菌肽对人肝癌细胞BEL-7402、直肠癌细胞HR8340均有杀伤作用^[20]。

3.5 毒性 蚕类抗菌肽是动物体的成分之一,它参与体内的生命进程,具有安全无毒副作用、无残留的生物学特性。

4 应用

蚕类抗菌肽不仅具有分子量小、热稳定强、水溶性好等特点,而且其抗菌谱广,更为重要的是蚕类抗菌肽只作用于原核细胞和发生病变的真核细胞。它的作用机制与抗生素阻断大分子生物合成的作用机理完全不同,因此显示出蚕类抗菌肽具有独特的研究和重要的应用价值。

4.1 在植物学上的应用 长期以来,因病菌的侵染而造成农作物生产的损失是巨大的。植物细菌和真菌病害的有效控制使科学家付出了艰辛的劳动。目前采用的防治方法主要有:采用不同的栽培管理方式,如轮作、避免带菌土壤和植物材料的传播;培育和利用抗病品种;使用化学杀菌剂。但由于抗菌育种的周期长,病原小种的分化速度往往超过品种更新换代的速度,因此抗病育种难以对新的病原小种作出及时反映;而杀菌剂的成本较高,长期使用会导致病原菌的抗药性,引起环境污染。因此都不是理想的防治方法。随着分子生物学的发展及植物基因工程技术的广泛应用,可以将蚕类抗菌肽应用到植物抗病基因工程中,通过分离并克隆蚕类抗菌肽的基因,然后将它们导入植物体内,这可能将会增强植物的抗病能力。

4.2 在畜牧业上的应用 抗生素作为抗菌型饲料添加剂长期添加于畜牧业中,为其发展作出了巨大的贡献,但因长期大量使用,导致了抗药菌株的产生以及药物残留等一系列问题,给人类健康带来严重威胁。蚕类抗菌肽作为一种广谱、高效、无残留的新型抗微生物药物在畜牧业中使用,将有明

显的优势和巨大的前景。温刘发等应用华南农业大学已开发的抗菌肽添加于断奶仔猪料中,饲喂试验结果表明,蚕抗菌肽可减轻断奶仔猪的腹泻。黄永彤等用蚕抗菌肽AD酵母制剂与5种抗生素及3种中草药进行肉鸡饲喂效果比较试验,结果表明,饲料转化率、平均体重、料肉比、成活率均无差异,可见抗菌肽对于改善畜产品品质、保障畜禽产品生产效率是大有可为的^[21]。温刘发等将蚕抗菌肽AD酵母制剂应用到粤黄鸡饲养中,试验结果表明,蚕抗菌肽酵母制剂作饲料添加剂的应用效果显著,它明显促进了小鸡生长,减少了排泄物氮元素含量,对粤黄鸡具有促生长、保健和治疗疾病的功能^[22]。

4.3 在医学上的应用 由于传统的抗生素长期广泛使用,许多病原菌对它产生了耐药性。随着对抗菌肽结构与活性的关系、作用机制及其基因表达调控机制认识的不断深化,设计一种高效的、有利于人类健康的抗菌肽来替代抗生素是完全可行的。蚕类抗菌肽因其成本低廉、易于获取正受到越来越多研究者的重视。家蚕体内自身含有大量的抗菌肽物质,同时蚕作为生物反应器可以表达出多种有用蛋白,生产出大量的蚕类抗菌肽。所以可以充分利用蚕类资源,开发出适合医学使用的抗菌肽产品。

4.4 食品 蚕类抗菌肽分子量小,结构高度紧密,而且具有广谱的杀菌活性,对与食品有关的多种革兰氏阴性和阳性细菌均有较强的杀灭作用。而且蚕类抗菌肽表现出良好的热稳定性,因此可用于食品的热加工。蚕类抗菌肽还可用于食品发酵中的杂菌污染,除了直接添加抗菌肽以外,还可把抗性基因转入发酵菌株。抗菌肽抑制微生物的生产是非常迅速的,而且其易被体内的蛋白酶水解消化,对人体无毒副作用。蚕类抗菌肽在酸性情况下活性最强,适于大多数酸性食品,尤其是饮料的防腐,有良好的溶解性和稳定性。因此,可以说蚕类抗菌肽是一种对人体无毒副作用的极有前途的新型食品防腐剂。

5 前景展望

目前,对抗菌肽的研究与应用尚处于试验研究阶段,还不能直接用于工业,但是其独特的药理功能将吸引着科研工作者不断深入。同时,蚕业也是我国非常古老的产业,拥有5000多年的悠久历史。我国蚕业还具有蚕桑资源丰富、饲养技术成熟、成本低廉以及产业化程度高等诸多优势,利用家蚕作为生物材料进行抗菌肽的科研与生产具有其他昆虫无法比拟的优势。特别是在我国加入世界贸易组织后,制药行业生产受到了很多新规则的限制,因此,蚕类抗菌肽的研究与应用对于21世纪的医药、食品防腐、畜牧养殖、生物防治等方面都具有重要的意义。

参考文献

- [1] ZASLOFF M. Anti-microbial of multicellular organisms[J]. Nature, 2002, 415: 389 - 395.
- [2] 叶星,白俊杰. 抗菌肽的研究及其在水产上的应用前景[J]. 大连水产学院学报, 2000, 15(4): 274 - 275.
- [3] 李秋剑. 哺乳动物抗菌肽的研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2006, 42(20): 60 - 62.
- [4] STEINER H D, HULTMARK A, ENGSTROM H, et al. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity[J]. Nature, 1981, 292: 246 - 248.
- [5] 黄自然,王少颐. 注射大肠杆菌诱导柞蚕蛹血淋巴产生抗菌物质[J]. 华

外,该中期预报模型的预报准确率达95%。

表3 中期模拟预报值与实际发生级别比较

Table 3 Medium-term simulation forecast value compared with the actual level

| 年份 Year | 预报值 Forecast value | 实测值 Actual value | 差值 Balance/ level | 级 | 年份 Year | 预报值 Forecast value | 实测值 Actual value | 差值 Balance/ level | 级 |
|------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|---|------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|---|
| 1987 | 2 | 1 | +1 | | 1997 | 1 | 1 | 0 | |
| 1988 | 1 | 1 | 0 | | 1998 | 2 | 3 | -1 | |
| 1989 | 5 | 5 | 0 | | 1999 | 1 | 1 | 0 | |
| 1990 | 3 | 4 | -1 | | 2000 | 1 | 1 | 0 | |
| 1991 | 2 | 1 | +1 | | 2001 | 2 | 1 | 0 | |
| 1992 | 4 | 4 | 0 | | 2002 | 1 | 1 | 0 | |
| 1993 | 2 | 2 | 0 | | 2003 | 3 | 5 | -2 | |
| 1994 | 1 | 1 | 0 | | 2004 | 1 | 1 | 0 | |
| 1995 | 2 | 1 | +1 | | 2005 | 2 | 1 | +1 | |
| 1996 | 1 | 1 | 0 | | 2006 | 2 | 1 | +1 | |

3.3 小麦赤霉病发生程度的短期预测模型

$$Y_{\text{短期}} = 0.0047 X_1 + 0.0248 X_2 - 0.1873 X_3 - 0.0064 X_4 - 0.4522 X_5 + 0.1695 X_6 - 0.0172 X_7 + 0.2210 X_8 + 15.4684 \quad (5)$$

式中, X_1 表示上年5月下旬降水量; X_2 表示上年7月中旬日照时数; X_3 表示上年8月上旬平均气温; X_4 表示上年8月下旬日照时数; X_5 表示上年9月下旬平均气温; X_6 表示上年12月下旬降水日数; X_7 表示上年12月下旬日照时数; X_8 表示当年3月上旬降水日数。

将(5)式进行预报检验,结果显示(表4),1990年的预报结果比实际发生程度低1级,1987、1991、1999、2000、2005、2006年的预报结果比实际发生程度高1级,2003年预测值比实际发生值低2级,其余年份预报值与实际发生值完全一致。按照误差小于1级算正确的设定,除2003年预报错外,该短期预报模型的预报准确率达95%。

4 结论与讨论

(1) 该模型对小麦赤霉病长期预报准确率达100%,中、短期预报准确率达95%,当然这与小麦赤霉病本身就是气象病的因素也有重要关联,同时由于大气环流变化存在时间上

的相关关系,这使得小麦赤霉病的数值预报具有了可预报性。

表4 短期模拟预报值与实际发生级别比较

Table 4 Short-term simulation forecast value compared with the actual level

| 年份 Year | 预报值 Forecast value | 实测值 Actual value | 差值 Balance/ level | 级 | 年份 Year | 预报值 Forecast value | 实测值 Actual value | 差值 Balance/ level | 级 |
|------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|---|------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|---|
| 1987 | 2 | 1 | +1 | | 1997 | 1 | 1 | 0 | |
| 1988 | 1 | 1 | 0 | | 1998 | 3 | 3 | 0 | |
| 1989 | 5 | 5 | 0 | | 1999 | 2 | 1 | +1 | |
| 1990 | 3 | 4 | -1 | | 2000 | 2 | 1 | +1 | |
| 1991 | 2 | 1 | +1 | | 2001 | 1 | 1 | 0 | |
| 1992 | 4 | 4 | 0 | | 2002 | 1 | 1 | 0 | |
| 1993 | 2 | 2 | 0 | | 2003 | 3 | 5 | -2 | |
| 1994 | 1 | 1 | 0 | | 2004 | 1 | 1 | 0 | |
| 1995 | 1 | 1 | 0 | | 2005 | 2 | 1 | +1 | |
| 1996 | 1 | 1 | 0 | | 2006 | 2 | 1 | +1 | |

(2) 中、长期预测为小麦赤霉病防治进行物资准备提供依据,而物资的采购时间与价格关系密切,因而可减少防治成本。短期预测为小麦赤霉病防治时间、用药剂量和防治次数提供依据。

(3) 动态预报模式中,预报结果比实际发生程度低1级的年份中1990年出现3次;预报结果比实际发生程度高1级的年份中1987和1991年分别出现3次,2000年(长期和短期)、2005年(中期和短期)和2006年(中期和短期)各出现2次。对这些年份赤霉病流行程度的预报结果出现了较为一致的预报偏差趋势,这可能是由于这些年份小麦赤霉病的流行与小麦易感病的花期相遇有关,需要进一步考察。

(4) 随着全球气候的变暖,整体气候带的北推,动态预报模式气象资料的采用和起报时间都需要作相应的调整,动态预报模式也要进一步优化和完善。

参考文献

- [1] 魏淑秋. 农业气象统计[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1985: 81-238.
- [2] 朱盛明. 相关系数稳定性分析方法及其应用[J]. 气象学报, 1982, 40(4): 497-501.
- [3] 胡永宏, 贺思辉. 综合评价方法[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 106-122.
- [4] 刘忠渊, 张富春, 毛新芳. 家蚕抗菌肽的特性与应用[J]. 生物技术, 2003, 13(5): 48-50.
- [5] MARCHINI D, GORDANO P C, AMONS R, et al. Purification and primary structure of ceratotoxin A and B, two antibacterial peptides from the noctuid caterpillar *Ceratitis capitata* [J]. Insect Biochem Mol Biol, 1993, 23(5): 591-598.
- [6] 黄自然, 廖富苹, 郑青, 等. 昆虫抗菌肽在医药上的应用[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 13(2): 79-83.
- [7] 温刘发, 何丹林, 张常明, 等. 抗菌肽酵母制剂作为饲料添加剂的应用前景[J]. 中国饲料, 2001, 23: 22-23.
- [8] 郭玉梅, 戴祝英, 胡云龙. 家蚕抗菌肽的一些性质及抗肿瘤活性[J]. 南京师范大学学报: 自然科学版, 1995, 18(1): 62-67.
- [9] 贾红武, 张双全, 戴祝英. 家蚕抗菌肽对K562白血病细胞的杀伤作用及对细胞超微结构的影响[J]. 蚕业科学, 1996, 22(4): 224-228.
- [10] 张卫民, 彭朝晖, 黄自然. 柞蚕杀菌肽D对人直肠癌细胞的杀伤作用及机制[J]. 蚕业科学, 1998, 24(3): 144-148.
- [11] 黄永彤, 黄自然, 黄建清, 等. 抗菌肽与抗生素饲喂肉鸡的效果比较[J]. 广东饲料, 2004, 13(2): 24-25.
- [12] 何丹林, 温刘发, 黄自然, 等. 蚕抗菌肽AD-酵母制剂对粤黄鸡肠道消化酶和饲料品质的影响[J]. 中国家禽, 2004, 26(7): 9-10.
- [13] 南农学院学报, 1981, 2(2): 65-68.
- [14] 张双全, 屈贤铭, 戚正武, 等. 昆虫免疫应答及抗菌肽应用前景[J]. 生物化学杂志, 1987, 3(1): 11-18.
- [15] 郭华荣, 张士瑾, 孔杰, 等. 中国家蚕抗菌肽基因的PCR扩增、克隆和序列测定[J]. 山东农业大学学报, 1998, 29(3): 351-355.
- [16] MORISHIMA I, SURINAKA S, UENO T, et al. Isolation and structure of ceratopins, inducible antibacterial peptides from the silk worm, *Bombyx mori* [J]. Comp Biochem Physiol, 1990, 95(3): 551-554.
- [17] 董占鹏. 蚕类抗菌肽及其研究进展[J]. 蚕学通讯, 2003, 23(3): 14-20.
- [18] 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]. 生物工程学报, 1999, 19(3): 14-18.
- [19] BOMAN H G, FAYE L. Cell-free immunity in cecropia. A model system for antimicrobial proteins [J]. Euro Biochem, 1991, 201: 23-31.
- [20] CARLSSON A, ENGSTROM P, BENNICH H. Atacin, an antibacterial protein from *Hyalophora cecropia*, inhibits synthesis of outer membrane proteins in *Escherichia coli* by interfering with omp gene transcription [J]. Infect and Immunity, 1991, 59: 3040-3050.
- [21] 陈留金, 王金星. 昆虫抗菌肽研究现状[J]. 生物工程进展, 1999, 19(5): 55-60.

(上接第195页)