

# 昆虫抗菌肽的研究进展

郭玉梅 戴祝英 综述

陈宜峰 审校

(南京师范大学生物系, 南京 210024)

昆虫的种类繁多, 约几百万种, 为适应各种不同的生态环境, 建立了自己独特的免疫系统, 抗菌肽就是免疫体系中的关键成分。过去, 抗菌肽的主要研究方面在昆虫免疫和昆虫生化, 目前不少工作从分子水平上进行探讨。

## 一、抗菌肽分子结构

昆虫抗菌肽是昆虫血淋巴中的一类生物活性肽, 分子量约为 3000—4000 道尔顿, 是由 30—40 个氨基酸组成的小肽, 具有强碱性、热稳定性、以及广谱抗菌的特点。

最早发现的抗菌肽是 cecropins, 是从天蚕 (*Cecropia moth*) 的免疫血淋巴中得到的高效抗菌肽, 所有的 cecropins 均为 31—39 个氨基酸残基组成, 不含半胱氨酸, 即不能形成分子内二硫键, 有强碱性的 N 端区域, 在 C 端有疏水段, 用二维核磁共振研究 cecropins 的结构, 发现它有两个  $\alpha$  螺旋, 两个螺旋之间有甘氨酸和脯氨酸形成的铰链区域<sup>[1]</sup>。在两个双翅目昆虫 (*Dipterans*)、麻蝇 (*Sarcophaga Peregrina*) 和果蝇 (*Drosophila*) 中, 已确定 cecropin A 和 sarcotoxin IA 的氨基酸顺序, 并且在核酸水平上有 73% 的同源性。昆虫 cecropins 是昆虫感染细菌后诱导而产生的, 由含 62—64 个残基的前体蛋白质合成, 前体蛋白质经过拼接、加工变成成熟肽。在上述昆虫中每一个 cecropin 均被单一拷贝的基因所编码, 并且基因中有内含子。以前一直认为 cecropins 是昆虫中唯一具有的, 但是 Bulet 等<sup>[2]</sup>在猪的肠中也发现一个 cecropin, 这可能暗示 cecropins 广泛存在于动物中。

Bulet 等<sup>[2]</sup>还从鞘翅目昆虫中发现了昆虫

免疫防御家族的一位新成员, 用灭活的细菌注入昆虫的幼虫, 从血淋巴中得到三种高效抑菌的抗菌肽 peptide A、B、C, 已确定它们的一级结构, peptide A 具有抗革兰氏阴性细菌的活性, 由 74 个氨基酸组成, 富含甘氨酸, 并且和已知的抗菌肽无同源关系。peptide B 和 C 有 43 个氨基酸残基, 含 6 个半胱氨酸, 和其它的昆虫防御素有同源关系, 这两种肽对革兰氏阳性细菌有抑制作用。

从亚洲蟾蜍中分离到三种肽, 类似 Bombinin (Bombinin-Like-Peptide), DH BLP-1、BLP-2、BLP-3, 但是 BLP 与 Bombinin (来源于 Bombinina 皮肤的抗菌溶血肽) 在氨基酸顺序上不完全同源, 它的抗菌活性也超过 Magainin 2 (*Xenopus* 皮肤抗菌肽)<sup>[3]</sup>。

从已经测定的几种抗菌肽的一级结构中可以看出, 组成抗菌肽的氨基酸有疏水性和亲水性两种, 而且亲水性的氨基酸残基在昆虫生理 pH 环境下往往带电荷, 这些多肽分子之间的氨基酸残基变化小, 保守性较强, 说明昆虫在生物进化过程中遗传的稳定性, 其免疫防卫系统中抗菌物质的生物合成由一些古老的基因所控制。

研究抗菌肽空间结构的最常用方法是二维核磁共振光谱 (NMR)。运用 NMR 氢谱共振测

得 Magainin 2 溶解在三氟乙醇(TFE)水溶液中时,为适应其亲水脂特性而呈  $\alpha$  螺旋结构<sup>[4]</sup>。David 等<sup>[5]</sup>用  $^1\text{H-NMR}$  在 pH5.8、含 30% 六氟乙醇溶液中研究了 cecropin A 和 melittin(蜂毒素)的杂合肽,这个肽有 26 个氨基酸,是由两个亲本肽的各自前 13 个残基组成的复合体,可描述为:CA(1-13)M(1-13) $\equiv$ CAM(1-26),它有一个酰胺化的末端,具强烈的抗菌活性,但对红细胞无作用。研究发现此肽有两个  $\alpha$  螺旋,即 4-12 和 16-26 残基,且 16-26 残基所形成的螺旋比另一个更稳定,杂合肽 17-26 残基的二级结构与 melittin 的 4-13 残基的结构相似。疏水的  $\alpha$  螺旋能占据脂质双层膜的一半,并同亲水脂的  $\alpha$  螺旋一起转动,这些特性都是抗菌活性所必需的。

由于细胞膜的环境与三氟乙醇等的疏水环境相似,抗菌肽在和细菌表面的细胞膜发生作用时所形成的构象可能与它们在疏水环境中相似,形成  $\alpha$  螺旋,中间有少量的  $\beta$  折叠和  $\beta$  片层结构。

## 二、抗菌肽的生物学效应及抗菌机制

近年来的一些研究结果表明抗菌肽具广谱抗菌作用。Michael 等<sup>[6]</sup>发现抗菌肽 Magainin 2 对大肠杆菌、大肠杆菌 D<sub>31</sub>、金黄色葡萄球菌、念珠球菌、绿脓杆菌、肠细菌、沙雷氏菌、变形杆菌、粪链球菌都有抑菌效果。黄自然<sup>[7]</sup>观察到柞蚕抗菌肽 D 对草绿色链球菌、乙型溶血链球菌、金黄色葡萄球菌等也有抑制作用。天然天蚕素和化学合成的天蚕素 A 对藤黄微球菌、巨大芽孢杆菌、绿脓杆菌等具有杀菌的生物活性<sup>[8]</sup>。实验证明抗菌肽对原虫有作用,可以杀死草履虫、变形虫和四膜虫。作者等人发现蚕抗菌肽及免疫血淋巴,对一些肿瘤细胞和宫颈癌实体瘤均有明显的杀伤作用(待发表)。戴祝英等<sup>[22]</sup>用家蚕抗菌肽对苜蓿 Y 纹夜蛾核型多角体病毒进行作用,发现抗菌肽在不同程度上抑制了病毒多角体的形成。

从中国柞蚕中提取的抗菌肽 D,对鼠造血细胞的生长、功能与分化产生作用,能调节淋巴细胞 DNA 的合成,以及粒性白细胞和巨噬细

胞的群体形成,也能影响 B 细胞抗体的产量<sup>[9]</sup>。

在非洲爪蟾 *Xenopus* 的皮肤、肠、脑中发现一种活性肽<sup>[10]</sup>,仅有 8 个氨基酸,它可能在伤口愈合和治疗炎症方面有作用。

关于抗菌肽的抗菌机制的研究,学者们做了许多实验工作。Anzai 等<sup>[12]</sup>利用一个脂质双层膜系统来探讨合成肽的性质,这些肽具有抑制革兰氏阳性细菌的作用,能合成以下四种肽:AC-(Ala-Arg-Leu)<sub>3</sub>-NHCH<sub>3</sub>(以 3<sub>3</sub> 表示),Ac-(Leu-Ala-Arg-Leu)<sub>2</sub>-NHCH<sub>3</sub>(4<sub>2</sub>),Ac-(Leu-Ala-Arg-Leu)<sub>3</sub>-NHCH<sub>3</sub>(4<sub>3</sub>),Ac-(Leu-Leu-Ala-Arg-Leu)<sub>2</sub>(5<sub>2</sub>),这些合成肽与不同的脂质双层膜作用,促进离子通道的形成,提高膜介导作用,并发现假如仅仅形成一个通道,其顺序为 4<sub>3</sub>>4<sub>2</sub> $\approx$ 5<sub>2</sub>>>3<sub>3</sub>。此结果与它们的抗菌活性相关,抗菌活性越大,形成通道的可能性越大。通道是阳离子通道,具有构象多样性。

Steiner 等<sup>[11]</sup>用 cecropin 及其结构类似物来研究抗菌肽的作用机制。他们采用脂质体为模型,结果发现若脂质体所带净电荷为负值,抗菌肽就结合到细胞膜上,膜被破坏,若减少抗菌肽 N 端的  $\alpha$  螺旋,则降低其破坏膜的能力。cecropin 结构类似物与细菌的结合力降低。尽管一些细菌对 cecropin 有抗性,但 cecropin 仍能以无效方式结合到细菌膜表面。相反,哺乳动物红细胞不能结合 cecropin,因此对 cecropin 具有抗性。

cecropin 具高度的水溶性,这与它们易弯曲的自由螺旋结构有关,并且 cecropin 以这种形式存在于血淋巴中,当其作用于细菌细胞膜时,cecropin 折叠成高度的亲水脂的  $\alpha$  螺旋结构,这种结构具有表面活性剂的活性,抗菌肽首先在细胞膜上形成孔道,破坏细胞膜,然后再改变整个细胞膜。

综上所述,抗菌肽的正电荷与酸性的磷脂头负电荷之间的相互作用对其抑菌性能是很重要的,肽分子 N 端的两性螺旋是裂解细菌的主要部分,C 末端的酰胺化对于抗菌肽的广谱抗菌有重要作用,抗菌肽在细菌质膜上形成离子通道,引起细胞内 K<sup>+</sup> 大量外渗,破坏膜势,

ATP 合成急剧下降,细胞内物质泄吐,引起细胞死亡。真核细胞的膜内含有胆固醇,它可能阻止抗菌肽插入脂双层膜,这也许是抗菌肽对真核细胞不起作用的原因之一。

### 三、抗菌肽的基因结构与基因工程

第一个被分析的 cecropin 基因是 cecropia 的 B 基因<sup>[13]</sup>,小的前体蛋白质的编码信息被内含子所间隔,在 *Sarcophaga* 中的一个基因<sup>[14]</sup>和 *Drosophila* 中三个紧密相联的 cecropin 基因<sup>[15]</sup>中也发现这种情况。cecropin B 的两个 cDNA 克隆显示这个蛋白质是由一个 62 个氨基酸的前体分子组成,前体 cecropin B 的一个转录单位长 1035 bp,并发现昆虫特异性的保护结构即帽子结构 ATCATTC。B 基因的产物即前体 cecropin B(64 Aa),包含一个信号顺序(22 Aa),一个仅有 4 个残基的前部分(pro part)和成熟 cecropin B,以及一个甘氨酸用于 C 末端酰胺化。cecropins 和冬季比目鱼(Winter flounder)的抗冻蛋白在基因组成上有相似之处,抗冻蛋白的 A 成分是由 82 残基的前体变成一个 37 残基的成熟肽,其基因是 1 Kb,有内含子长 600 bp,同样也是甘氨酸残基用于 C 末端的酰胺化,这种情况在许多肽激素、cecropins 和 melittin 中都是如此。

Cecropia 的 cecropin 基因家族是一个大的基因族,约有 20 Kb,基因间有插入成分。*Drosophila* 的 cecropin 基因家族包含三个活性基因和两个假基因<sup>[16]</sup>。兔巨噬细胞的防御因子 MCP<sub>2</sub> 约 33 个残基,前体有 95 个残基,基因约为 13 kb,有两个内含子<sup>[16]</sup>。Bombyxin 是家蚕中分子量为 5 kd 的脑分泌肽,这种类似胰岛素因子的基因无内含子,但在两个编码区域之间有一个似转录因子的成分<sup>[17]</sup>。另外,在 cecropia 的基因 A 中有反向重复顺序,它类似于 *Drosophila mauritiana* 中的 mariner 的转座子,基因 D 中存在衰减子。在所有已被分析的 cecropin 基因中,内含子的位置是保守的,而且在所有已知的氨基酸顺序中,第二个外显子的 5' 末端的谷氨酸残基总是保持不变的。Southern 分析结果显示 cecropin A 和 B 基因是单拷贝,而 D 基因是单或双拷贝。每一个 cecropin 基因均有一个 TATA box,一个帽子位点(Capsite)和一个多腺苷酸信号 AATAAA。Sun 等<sup>[18]</sup>认为 GGGATTCCT 顺序作为免疫基因转录激活物的一个结合位点。

DNA 顺序表明双翅目和鳞翅目昆虫的 cecropin 基因起源于一个共同的祖先基因。*Drosophila* 和 *Sarcophaga* 的 cecropins 与 cecropia cecropin A 和 B 的氨基酸末端更相近,而 cecropia cecropin A 和 B 的氨基酸末端更相近,而 cecropin D 形式在两种蝇中却不存在。因此在鳞翅目中,cecropin D 的进化是有特异性的。已经在猪的肠中发现 cecropin P<sub>1</sub>,因此对昆虫 cecropin 基因的认识可能导致人们去研究哺乳动物怎样防御细菌感染。

关于抗菌肽的基因工程,国内外学者做了许多研究工作。黄自然等<sup>[23]</sup>用电激法将柞蚕抗菌肽基因导入水稻原生质体中,将处理后的原生质体进行抗生素耐药性筛选,有一定细胞再生,现正在诱导分化成苗。李丹青等<sup>[24]</sup>将柞蚕抗菌肽基因克隆于质粒,再将其转入根癌农杆菌,导入烟草等农作物中,取得初步进展。Nordeen<sup>[19]</sup>将 cecropin 基因导入烟草后,再感染青枯菌,发现烟草死亡率降低。Vayda<sup>[20,21]</sup>将抗菌肽基因 Shiva-1 基因导入烟草并且将 cecropin 基因导入马铃薯,希望得到抗病植株。将具有杀菌作用的抗菌肽的基因导入植物中,为未来获得抗病植株提供了广阔的前景。

抗菌肽溶解细菌、脂质体,对真核细胞很少或几乎没有作用,可作为生物基本防御的重要部分。因此对昆虫抗菌肽的研究不仅对生物体乃至整个生物界的防御体系和机制有了新的认识,而且显示了在农业和医学上的应用前景,为植物的抗病育种开辟了一条新的途径。

### 参考文献

- [1] Holak, T. A. et al. *Biochem. J.*, 1988; 27: 7620—7629
- [2] Bulet, P. et al. *J. Biol. Chem.*, 1991; 266 (36): 24520—24525
- [3] Gibson, Bw. et al. *J. Biol. Chem.*, 1991; 266 (34): 23103—23111
- [4] Dominique, M. et al. *FEBS Lett.*, 1991; 277(1): 21—26
- [5] David, S. et al. *Eur. J. Biochem.*, 1991; 199: 285—291
- [6] Michael, Z. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1987; 84: 5449—5453
- [7] 黄自然, 科学通报, 1986; 14: 1107—1109
- [8] Andreu, D. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1988; 80: 6475
- [9] Yasuji, O. et al. *Immunology Lett.*, 1989; 20: 127—132
- [10] Emilia, S. et al. *FEBS. Lett.*, 1988; 288(2): 337—340
- [11] Steiner, et la. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1988; 939: 260—266

- [12] Anzai, K. et al. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1991; 1064(2): 256—266
- [13] Xanthopoulos, et al. *Eur. J. Biochem.*, 1988; 172: 371—376
- [14] Kania, A. et al. *FEBS Lett.*, 1989; 258: 199—202
- [15] Kysten, P. et al. *EMBO, J.*, 1990; 9: 217—224
- [16] Ganz, G. et al. *J. Immunology.*, 1989; 143: 1358—1365
- [17] Kawakami, A. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1989; 86: 6843—6847
- [18] Sun, S. et al. *Eur. J. Biochem.*, 1991; 196: 247—254
- [19] Nordeen, R. O. et al. *Plant Physiol.*, 1992; 99: Abstract 279
- [20] Vayda, M. E. et al. *The Molecular and Cellular Biology of the Potato. C. A. B. International. UK*, 1990
- [21] Vayda, M. E. et al. *Transgenic Research.*, 1992; 1: 149—163
- [22] 戴祝英等, 江苏省生物技术研讨会文集, 1989; 224—227
- [23] 黄自然等, 蚕业, 1992; 1: 2—6
- [24] 李丹青等, 蚕业科学, 1990; 16(22): 110—112

## The progress of insects antibacterial peptides

Guo Yumei      Dai Zhuoying      Chen Yifeng

**Abstract** Insects have highly effective cell-free immune systems which are induced by a bacterial infection. As a response, the insects produce a set of antibacterial peptides which are isolated from haemolymph of the insects. The antibacterial peptides contain 30—40 amino acid residues with strongly basic  $\text{NH}_2$ -terminals and hydrophobic  $\text{COOH}$ -terminals. Some antibacterial peptides molecule structures are investigated by two-dimensional  $^1\text{H-NMR}$ . Many scholars make use of a planar lipid bilayer system to examine the action of synthetic basic peptides. The channel was formed and an increase in ion permeability of the membrane occurred. So we may say the antibacterial peptides are key components needed in insect immunity.

(接 43 页)

- [35] Jeyaprakash. A. , J. W. et al. , *Mol. Gen. Genet.* , 1991, 225(3): 363—368
- [36] Pavlakis, et al. , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80: 397—401
- [37] Furst, P. et al. , *Cell*, 1988, 55(4): 705—717
- [38] Zhou, Peng Bo et al. , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88(14): 6112—6116
- [39] 茹炳根等, 生物化学与生物物理进展, 1991, 18(4): 254—259
- [40] Weser, U. et al. , *Ger. Offen, DE 3433076 (A1)*, 1986
- [41] Laib, J. E. et al. , *Biochemistry*, 1985, 24: 1977—1986
- [42] 黄淑惠, 微生物学通报, 1991, 18(1): 11—14
- [43] Etcheverry, T. , et al. , *Biotechnology*, 1986, 4: 726—730
- [44] 李载平等, 生物化学与生物物理学报, 1987, 19(37): 234—240
- [45] Fijita, V. S. et al. , *Cell. Biol.* , 1990, 9(2): 111—118

## Metallothionein in Eukaryotic Microorganism

Lin Zhilan      Chang Limei

(The College of Life Science, Peking University, Beijing, 100871, China)

### Abstract

A review is reported on metallothionein (MT) from eucaryotic microbial sources with 45 references. In yeast and fungi, cellular resistance to heavy metal cytotoxicity is mediated either by binding metal ions to proteins of the metallothionein type or by chelating to phytochelatin-peptides (PCs) of the general formula  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{Gly}$ . The present review involves yeast metallothionein sequence and metal-binding properties, the MTs and PCs structure and function as well as the structure of the yeast CUP1 (MT genes), mechanisms of gene amplification and gene regulation, then, we describe the application of the yeast MTs in medicine, metal recovery and that of CUP1 promoter in biotechnology.

**Key words:** Metallothionein, Fungi, Yeast.