

家蝇抗菌肽的研究与应用*

罗金香 杨春龙** 吴伟东

(南京农业大学理学院 南京 210095)

Study and application of *Musca domestica* antimicrobial peptides. LUO Jir Xiang, YANG Chur Long, WU Wei Dong (College of Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract In recent years, the antimicrobial active substances and especially antimicrobial peptide of houseflies were investigated extensively. The antimicrobial peptides could exhibit biological activities against bacteria, fungi, cancer cells and viruses. By the treatment with acupuncture, acupuncture carrying bacteria, heat shock, ultrasonic vibration, radioactive ray, high frequency electromagnetism or physiological saline etc., this peptide could be induced into houseflies. The antimicrobial peptide could exist stably in -20 ~ 100 °C, in the solution of extreme pH value, or in the solution of concentrated saline. The structure, mode of action and molecular biology of antimicrobial peptides of houseflies were summarized, and the application prospect was discussed.

Key words housefly, antimicrobial peptide, antimicrobial active substance

摘 要 近年来,对家蝇 *Musca domestica* 体内外抗菌活性物质的研究受到人们广泛的关注,其中研究较多的是抗菌肽。家蝇抗菌肽对细菌、真菌、肿瘤癌细胞和病毒等具有生物活性,可通过针刺、带菌针刺、超声波、放射性射线、高频电磁场和生理盐水等方法诱导增量产生,能耐极端的温度和 pH 值的溶液,在高浓度盐溶液中也很有稳定。文章还对家蝇抗菌肽的结构特点、作用机理与分子生物学研究做了概述,同时对家蝇抗菌肽的应用前景进行了讨论。

关键词 家蝇, 抗菌肽, 抗菌活性物质

* 江苏省科技厅“国家南方农药创制中心江苏基地”开放课题资助。

** 通讯作者, E-mail: chunlongyang@yahoo.com.cn

收稿日期:2004-06-02, 修回日期:2004-09-25

家蝇 *Musca domestica* 隶属昆虫纲 双翅目、环裂亚目、家蝇科。体内外通常携带有害因子数量多达数万亿,能够机械传播人、畜多种病原体如细菌、病毒和寄生虫卵等^[1,2],而自身并不感病。即使在人工大规模高密度饲养的条件下,也不会发生集体染病,这是缘于家蝇体内外抗菌活性物质的作用。这些抗菌活性物质包括血淋巴受体外异物刺激而增加表达量的抗菌肽、凝集素,幼虫排放到体外有生物活性的分泌物,表皮中的几丁质,也有存在于其他组织器官或代谢产生的粪产碱菌、有机化合物和尿囊素。多种抗菌活性物质构成了家蝇特殊免疫防御机制,使其能够长期稳定维持家蝇生存而免受细菌、真菌、病毒、肿瘤癌细胞和寄生虫等侵染。在当前有害生物易产生抗药性,而新型抗菌药物开发又非常困难的情况下,许多专家将注意力转向家蝇这种独特的昆虫资源^[3]。至今研究最多的是家蝇抗菌肽,内容主要涉及其生物活性、诱导产生方法、作用机制和分子生物学等。研究的最终目的在于开发出新一代高效、无毒副作用和作用机制独特的抗菌药物。

1 家蝇抗菌肽的生物活性

有关学者已在地中海实蝇 *Ceratitis capitata*^[4]、果蝇 *Drosophila melanogaster*^[5]和厩螻蛄 *Stonozoxys peregrina*^[6]中分离到具有不同生物活性的抗菌肽。在棕尾别麻蝇 *Sarcophaga peregrina* 和伏蝇 *Phormia terranova* 体内分离到了 sarcotoxin I^[7]、II^[8]、III^[9]和 dipteracin^[10]等具有抗菌活性的蛋白。而在家蝇血淋巴中既分离到了分子量较小的生物活性肽/蛋白,又分离到分子量较大的凝集素溶菌酶等多种抗菌肽。这些抗菌肽抗细菌、真菌、寄生虫,更引人注目的是它们还能杀伤多种肿瘤癌细胞和病毒,而对正常的体细胞无毒副作用。抗革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌,如金黄色葡萄球菌、白葡萄球菌、绿脓假单胞菌、大肠杆菌等。还抗植物细菌性病害如水稻白叶枯病菌,大白菜软腐病菌和引起人类疾病的痢疾杆菌、肺炎杆菌。对一些真菌如白念珠菌和白僵菌也有很好的生物活

性,也对令人畏惧的肿瘤癌细胞有活性。邱晓燕等分离到分子量为 4 kDa 和 9.6 kDa 的抗菌肽,较低浓度下能有效抑制人胃癌细胞 MGC80-3 和 BGC-823、人乳腺癌细胞 MCF-7 以及人肺癌细胞 SPC-A1 的体外增殖^[11]。还抑制病毒侵染和繁殖,陈艳等用蝇蛆组织匀浆液处理流感病毒表现出非常好的防效^[12]。这些抗菌肽活性浓度在 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 级,其抑菌效果与传统抗生素相当甚至超过之。有报道表明苍蝇抗菌肽的抗菌活性超过了青霉素^[13],与目前广泛使用的抗生素及农用杀菌剂不产生交互抗性,不诱导病原菌产生抗性突变,因此有望开发成为新一代优秀抗癌、抗病毒或抗病菌药物。

2 家蝇血淋巴抗菌肽的诱导产生

当家蝇处于不适宜的环境条件或体壁受损伤、受异物侵染时,血淋巴中受基因控制的活性物质表达量会显著增加。目前已经成功地使用不同的诱导方法对不同虫态进行诱导并获得抗菌物质的增量表达和新蛋白的激活产生^[14,15,54]。周永富等采用针刺损伤法诱导家蝇 3 龄幼虫,除原有抗菌蛋白的表达获得增强外,还激活了新蛋白的产生,这种新蛋白可能也有抗菌活性^[16]。盛长忠等采用针刺、带菌针刺、超声波均成功地诱导家蝇产生了抗革兰氏阴性球菌(大肠杆菌,变形杆菌)的抗菌肽^[17]。陈留存等采用大肠杆菌诱导家蝇成虫并从血淋巴分离提取出一种对革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌、白葡萄球菌)和阴性菌(绿脓假单胞菌、大肠杆菌)都有活性的抗菌肽 CM III^[18]。用于家蝇血淋巴诱导的诱导源很多,如物理因子:超声波、高频电磁场、 γ 射线、X射线、紫外线、热激、体壁损伤法等;生物因子:菌类(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌)及生理盐水等。在诸多诱导方法中,体壁损伤法既经济、方便,效果又好。不同诱导源诱导产生的抗菌物质抗菌谱有所差异,并发现经菌类诱导产生的抗菌物质似乎有免疫记忆现象。齐静姣等以⁶⁰Co γ 射线、活的大肠杆菌、热灭活的金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌和生理盐水为诱导源,结果表明细菌诱导的抗菌谱

较广,⁶⁰Co γ 诱导的抗菌谱较窄,经热灭活的绿脓杆菌和金黄色葡萄球菌对相应菌的抗性较其它菌强^[19]。家蝇血淋巴抗菌物质动力学研究表明,不同诱导源诱导产生最大活性高峰各有一个最佳诱导强度和时问^[19]。诱导强度低,效果不明显,强度大会致虫体死亡,一般诱导后36~48 h 出现活性物质表达量高峰^[20]。从家蝇血淋巴抗菌物质诱导的研究可以推测诱导抗菌物质基因的表达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,它再将不同信号传递给细胞核内染色体上,从而激活相应基因启动和表达^[21]。诱导机理研究对揭示家蝇防御机制具有重要意义,是寻找高活性抗菌肽的基础。

3 抗菌肽的分类、结构特点和理化性质

自1981年 Steiner 等从惜古比天蚕滞育蛹中分离到抗菌肽天蚕素(cecropin)并测定其多肽化学结构以来^[22],已从昆虫中分离出170多种抗菌肽^[23],根据其结构和功能不同可分为5类^[24,53]:天蚕素类,具有2个两性的 α 螺旋结构,分子量在4 kDa左右,对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌都有抗性^[25]。昆虫防御素类,含有半胱氨酸且形成二硫键,具有 α 螺旋和 β 折叠结构,分子量为4 kDa,对革兰氏阳性菌有生物活性^[26,27]。富含脯氨酸的抗菌肽,分子量为2~4 kDa,抗革兰氏阴性菌^[24]。富含甘氨酸的抗菌肽,分子量为10~30 kDa,对革兰氏阴性菌有活性^[28]。家蝇抗菌肽属于以上类型的有MDL-3,推测属于的有MDL-1,不能完全肯定的有MDL-2^[29]。

人们已从家蝇血淋巴分离到多种活性抗菌肽,它们的分子量在4~86 kDa,由51~111个氨基酸组成,不含甲硫氨酸,不含或含少量半胱氨酸,不形成二硫键,富含碱性氨基酸,等电点大于7。在生理条件下,柏鸣等对家蝇抗菌肽进行圆二色分析,其二级结构构像单元以无规卷曲(包括 β -转角)为主,26.6% α 螺旋,23.7% β 折叠,49.7% β 转角与无规卷曲^[30]。家蝇抗菌肽的三级空间结构还在进一步研究之

中。

家蝇抗菌肽有较稳定的理化性质,能耐极端温度,经-20℃冷冻或100℃沸水浴处理后,抗菌肽的生物活性变化不大,还耐高浓度盐溶液、较极端的pH溶液。抗菌肽水溶性好,呈碱性。

4 家蝇抗菌肽的作用机理

家蝇抗菌肽之所以不易产生抗药性,在于其独特的作用机理。当前,家蝇抗菌肽抗真菌和病毒的作用机理还不十分清楚,有待进一步研究,而对细菌和肿瘤细胞的作用机理研究得相对较多。一般认为是通过破坏细菌的细胞膜而杀伤细菌,细菌有外膜和内膜2种膜系。外膜富含带负电荷的脂多糖,内膜为质膜。通过静电引力抗菌肽首先与细菌外膜结合,然后与内膜作用,扰乱膜脂分子的排列,改变细胞膜通透性,在细胞膜上形成许多孔道,使细胞内的原生质扩散,并从孔道向胞外渗漏,最终导致细胞完全解体,起到抑菌杀菌作用^[31,32]。文彩虹等研究表明抗菌肽能引起肝癌细胞SMMC-7721膜通透性增高,抑制能量代谢,抑制分裂增殖^[33]。

5 家蝇抗菌肽分子生物学

昆虫防御系统中存在一系列抗菌肽,每一种抗菌肽都有自己特定的抗菌谱,它们合力作用几乎可以抵抗所有的感染源^[34],如果蝇防御系统中至少存在7种不同的抗菌肽^[35]。家蝇血淋巴防御系统也是如此。目前已对家蝇不同抗菌肽基因采用不同策略和技术路线进行了克隆。夏平安等构建了家蝇基因组文库,从诱导的蝇蛆体内提取基因组DNA,采用Bell随机酶切,回收10~23 kb目的DNA片段,经匹配与磷酸化的EMBL3 BamHI酶切载体臂连接,在体外包装成活的重组噬菌体,转染KW₂₅₁宿主菌,文库效价 5×10^4 pfu/mL,成功地构建了家蝇基因组文库^[36],为后续分子杂交筛选和鉴定重组 λ DNA,最终得到目的基因打下了基础^[37]。王来元等首先构建了家蝇cDNA文库,从诱导的家

蝇体内提取总 RNA,分离到 mRNA,然后进行 cDNA 的合成、重组,构建了完整、有效的 cDNA 文库,滴度 3.46×10^5 pfu/mL,重组率 99.6%,为下一步家蝇抗菌肽基因的 cDNA 克隆奠定了基础^[38]。王来城等以家蝇 cDNA 文库为模板,采用 PCR 扩增出防御素基因片段,再进一步扩增 3' 和 5' 端序列,得到全长 430 bp 的 cDNA 序列,其中开放阅读框可以编码 92 个氨基酸残基的短肽^[39]。分析表明家蝇防御素成熟肽由 40 个氨基酸残基组成,推测其二级结构由 3 部分组成,即 N 端的 loop、1 个 α 螺旋和 2 个反向平行的 β 片层。为进一步重组表达提供了重要的基因源。家蝇抗菌肽对原核生物细胞具有广谱的毒杀作用而对真核细胞毒性较小,缘于两者的细胞膜结构不同。为寻找到高效的表达载体,许小霞等以 GenBank 中报道的家蝇天蚕素基因为模板设计引物,运用反转录聚合酶链式反应从家蝇体内扩增出抗菌肽天蚕素的开放阅读框,分析其成熟肽,重新合成 1 对引物,并在碳端突变和酰胺化,再利用半嵌套式 PCR 扩增出其成熟肽,然后与酵母表达载体 pPICZnA 重组构建高效表达质粒^[40]。下一步的表达和抗菌肽的纯化还在进一步研究之中,有望通过基因工程途径开发出高效的家蝇抗菌肽产品。

6 家蝇抗菌肽的应用前景

家蝇抗菌肽具有分子量小,受温度影响小,水溶性好,无免疫原性,广谱的生物活性等特点,可以抑杀多种细菌、真菌、病毒,更令人兴奋的是还能杀伤多种肿瘤细胞,但不损伤正常的体细胞,无毒副作用。因此它可以被广泛用于农业、医药、食品等领域。农业方面,采用分子生物学和基因工程的方法将家蝇抗菌肽基因导入动、植物体内获得优良的抗病品系并在其种内遗传,降低成本,增加收入。东京大学药学部教授名取俊二从苍蝇蛹中分离出一种由 39 个氨基酸组成的抗菌肽,并将其基因进行克隆成功地导入烟草,获得抗野火病菌的烟草品系^[41]。将抗菌肽基因表达于真核细胞,获得大量抗菌肽,进行构效关系研究并进行分子设计,

筛选出高活性抗菌肽,然后通过基因工程大量生产。医药方面,由于其抗菌谱广,还具有抗肿瘤等重要药用价值,不损伤人体正常细胞,与传统阻断生物大分子合成的抗生素具有不同作用机理,且不易产生抗药性,在目前抗生素抗药性问题非常突出,而开发新型抗生素又非常困难的情况下,家蝇抗菌肽有望开发成为新一代肽类抗生素。如已有应用基因工程技术开发的具有抗病功能的高新技术保健品工程蝇抗菌肽问世^[42]。还可通过基因工程方法将家蝇抗菌肽基因导入肿瘤癌细胞,对癌症基因治疗提供帮助。家蝇抗菌肽对人体无毒副作用,也可以作为绿色食品添加剂。当然,抗菌肽在家蝇体内含量少,分离和纯化比较困难,体外易被蛋白酶水解,要得到大量能用于生产实践的抗菌肽还需要作出更多的研究和努力,如抗菌肽抗菌谱广,需要用基因工程获得大量抗菌肽,需稳定的表达载体;抗菌肽富含碱性氨基酸易被蛋白酶水解,急需研究其构效关系,进行分子设计,结构修饰,提高稳定性,增加活性。

值得指出的是,人们还从家蝇体内外提取到其它抗菌活性成分。如张文吉等从家蝇幼虫饲料残渣中提取出抗植物病害活性物质^[43,44]。陈美等从家蝇幼虫饲料残渣中提取出抗植物线虫活性物质^[45]。苏水莲等从家蝇蛆表皮和蛹壳中提取出几丁质,发现对植物生长发育具有调节作用^[46];几丁质也具有直接杀菌、抑菌作用^[47];还可以诱导植物合成植物保护素,增强植物抗病虫的能力^[48]。曹小红等从家蝇蛹中提取出具有抑菌和抗癌作用的凝集素^[49]。丁友真等从家蝇幼虫体内分离出对金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌等致病菌有很强抑制作用存在于消化道内的粪产碱菌,并揭示了家蝇蛆粉治疗疮伤的机理^[50]。Karen 等用甲醇从家蝇末龄幼虫体内提取具有抗真菌和细菌活性物质 1-LPE,分子量为 451.2 Da^[51]。苍蝇体内蛋白质代谢还可产生尿囊素,而尿囊素具有杀菌作用,可医治皮肤伤口,防止恶性化脓^[52]。家蝇体内外具有多种抗菌物质是其在杂菌横生的环境中得以生存的重要物质基础。目前,对血淋巴抗

菌肽研究得比较深入,对家蝇体内外其他活性物质的研究还处于探索阶段,对家蝇抗菌活性物质的进一步研究具有十分重要的理论意义和应用价值。

参 考 文 献

- Graczyk T. K., Knight R., Gilman R. H., Granfield M. R. *Microbes Infect.*, 2001, **3**: 231 ~ 235.
- Sukontason K., Bunchoo M., Khantawa B., Sukantason K., Piangjai S., Choochote W. *J. Vector Ecol.*, 2000, **25**: 114 ~ 117.
- Moreira C. K., Capurro M. de L., Calvo E., Silva Jr. P. I., James A. A. *et al. Insect Biochem. Mbl. Biol.*, 2003, **33**(4): 389 ~ 395.
- Marchini D., Giordano P. C., Amons R., Bernini L. F., Dallai R. *Insect Biochem. Mbl. Biol.*, 1993, **23**(5): 591 ~ 598.
- Cociancich S., Bulet P., Hetru C., Hoffmann J. A. *Parasitol. Today*, 1994, **10**: 132 ~ 139.
- Lehane M. J., Wu D., Lehane S. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, **94**(21): 11 502 ~ 11 507.
- Okada M., Natori S. *Biochem. J.*, 1983, **211**: 724 ~ 734.
- Ando K., Okada M., Natori S. *Biochemistry*, 1987, **26**: 226 ~ 230.
- Baba K., Okada M., Kawano T. *J. Biochem.*, 1987, **102**: 69 ~ 74.
- Dimarcq J., Keppi E., Dunbar B. *Eur. J. Biochem.*, 1988, **171**: 17 ~ 22.
- 邱晓燕, 刘艳, 陈小麟, 陈奕欣. 中华卫生杀虫药械, 2003, **9**(1): 13 ~ 16.
- 陈艳, 吴建伟, 李金富, 国果, 郎书源等. 贵阳医学院学报, 2002, **27**(2): 100 ~ 103.
- 刘杰, 刘天龙. 今日科技, 1998, **8**: 4.
- 饶军华, 周永富, 阳建春, 吴晓萍, 郑青等. 昆虫天敌, 1999, **21**(3): 121 ~ 125.
- 齐静姣, 曲传智, 马玉红, 杨莉, 何芳等. 洛阳医学专学报, 2000, **18**(1): 4 ~ 6.
- 周永富, 饶军华, 阳建春, 吴晓萍, 李文楚. 生物学杂志 1997, **14**(77): 23 ~ 26.
- 盛长忠, 耿华, 叶玲玲, 安春菊, 李得森等. 南开大学学报, 2002, **35**(1): 7 ~ 11.
- 陈留存, 王金星, 刘瑶, 王来元, 王来城等. 山东大学学报, 2001, **36**(3): 351 ~ 357.
- 文静姣, 曲传智. 洛阳医学专学报, 1999, **17**(1): 35 ~ 37.
- 刘晖, 万启惠, 张曦, 贺利芳, 黄学贵. 中国公共卫生, 2004, **20**(4): 427 ~ 428.
- 翟朝阳. 昆虫学报, 1996, **39**(1): 99 ~ 104.
- Steiner H., Hultmark D., Engstrom A. *Nature*, 1981, **292**: 246 ~ 248.
- Phillipe B., Charles Hetru J. D. *Devel. Compar. Immunol.*, 1999, **23**: 329 ~ 344.
- Xavier L., Alexandr N., Jean-Paul B., Jean Pierre R., Charles H. *Insect Biochem. Mbl. Biol.*, 1998, **28**(12): 1 059 ~ 1 066.
- Sophia E., Dan H. *Insect Biochem. Mbl. Biol.*, 1999, **29**(11): 965 ~ 972.
- Bonmatin J. M., Bonnat J. L., Gallet X., Vovelle F., Ptak M., *et al. J. Biol. NNR*, 1992, **2**: 235 ~ 256.
- Cornet B., Bonmatin J. M., Hetru C., Hoffmann J. A., Ptak M., Vovelle F. *Structure*, 1995, **3**: 435 ~ 448.
- Brey P. T., Hultmark D. (eds.), *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*. Chapman Hall, 1988. 40 ~ 66.
- 宫霞, 乐国伟, 施用晖, 付景春. 无锡轻工大学学报, 2003, **22**(6): 25 ~ 30.
- 柏鸣, 周立. 中国生物化学与分子生物学报, 2002, **18**(5): 633 ~ 637.
- 宫霞, 施用晖, 乐国伟. 昆虫学报, 2004, **47**(1): 8 ~ 13.
- 周义文, 尹一兵, 涂植光, 陈辉, 张雪梅等. 中国抗生素杂志, 2004, **29**(5): 272 ~ 274.
- 文彩虹, 曲传智, 李东英, 张晓琴. 河南肿瘤学杂志, 2004, **17**(4): 100 ~ 103.
- Ovso L. Jr. *Cellular Mbl. Life Sci.*, 2002, **59**: 1 138 ~ 1 150.
- Hoffmann J. A., Hetru C., Reichhart J. M. *FEBS Lett.*, 1993, **325**: 63 ~ 66.
- 夏平安, 刘维全, 江禹, 李晓艳, 殷震. 中国兽医学报, 2003, **23**(5): 421 ~ 423.
- 杨歧生编著. 分子生物学基础. 浙江大学出版社, 1994, 7.
- 王来元, 王金星, 赵小凡, 王来城, 康翠杰. 动物学研究, 2001, **22**(2): 89 ~ 92.
- 王来城, 王金星, 王来元, 赵小凡. 动物学报, 2003, **49**(3): 408 ~ 413.
- 许小霞, 徐兴耀, 金丰良, 张古忍, 张文庆. 蚕业科学, 2004, **30**(1): 90 ~ 94.
- 名取俊二. 日经生物技术, 1995-4-10: 6.
- 干信, 王常高, 张迎庆, 李庆国. 湖北工学院学报, 2001, **16**(4): 1 ~ 4.
- 张文吉, 明九雪, 罗记台, 韩喜莱, 赵德友, 张丽. 北京农业大学学报, 1993, **19**(2): 103 ~ 104.
- 张文吉, 明九雪, 罗记台, 韩喜莱, 宁鸣辉. 植物保护学报, 1994, **21**(1): 90, 96.
- 陈美, 陈小麟. 厦门大学学报, 2003, **42**(6): 810 ~ 814.
- 苏水莲, 李娟, 胡雅琼, 谢学斌, 廖华. 赣南医学院学报, 2002, **22**(3): 227 ~ 229.
- 张静, 扬洪强, 魏钦平. 植物学通报, 2003, **20**(2): 178 ~ 183.
- Vander P., Varum K. M., Domard A. E., Gueddari N. E., Moerschbacher B. M. *Plant Physiol.*, 1998, **118**(4): 1 353 ~ 1 359.
- 曹小红, 陈一, 张燕, 高嘉, 陈锦英等. 中华微生物学和免疫学杂志, 2003, **23**(10): 297 ~ 300.
- 丁友真, 张书芳, 高锦亚, 范果仪. 中国媒介生物学及控制杂志, 1997, **8**(3): 181 ~ 183.
- Karen M., Elke C., Désiré D., Arnold D., Liliane S. *Insect Biochem. Mbl. Biol.*, 2004, **34**: 43 ~ 49.
- 熊海华. 中小企业科技, 2002, **10**: 4.
- 宫霞, 乐国伟, 施田辉. 昆虫知识, 2004, **41**(2): 110 ~ 115.
- 安青菊, 石明, 郝友进, 盛长忠, 耿华等. 昆虫学报, 2003, **46**(5): 545 ~ 548.