

家蝇抗菌肽及其基因工程研究进展

王鑫¹, 刘晖^{1*}, 沈玉娟², 曹建平² (1. 遵义医学院寄生虫学教研室, 贵州遵义 563003; 2. 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025)

摘要 家蝇抗菌肽是家蝇体液免疫中的重要组成部分, 是对细菌、病毒、真菌、肿瘤细胞和原虫均有抑制作用的小分子蛋白。随着细菌的耐药性和耐药菌株的出现, 人们对家蝇抗菌肽的研究愈来愈关注, 文中对家蝇抗菌肽的结构分类、生物学特性、表达调控和基因工程等方面进行了综述, 并对其未来发展进行了展望。

关键词 家蝇; 抗菌肽; 分类; 生物学特性; 基因工程

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)10-04273-03

Research Advances in Antimicrobial Peptide of *Musca domestica* and Its Genetic Engineering

WANG Xin et al (Department of Parasitology, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003)

Abstract Antimicrobial peptide of *Musca domestica* is an important part of its humoral immunity and it is a class of small molecule protein which has a positive effect on bacteria, viruses, fungi, tumor cells and protozoa. With the appearance of bacterial resistance and drug-resistant strain, an increasing number of studies focus on antimicrobial peptide. The classification, biological characteristics, expression and regulation, genetic engineering of antimicrobial peptides were reviewed, the future development was forecasted.

Key words *Musca domestica*; Antimicrobial peptide; Classification; Biological characteristics; Genetic engineering

抗菌肽是昆虫先天性免疫系统对各种病原微生物做出快速反应的重要组成部分^[1], 是宿主抵御外界微生物侵入体内的分子屏障, 它具有分子量小、抗菌谱广的特点, 对细菌、真菌、病毒、肿瘤细胞、寄生虫均有杀伤作用。近年来由于细菌耐药和临床耐药菌株的出现, 使抗菌肽成为抗生素最有潜力的替代物。家蝇分布广泛, 生活环境肮脏, 携带多种有害病原微生物, 在接触过程中会机械地传递到人或动物身上^[2], 但在家蝇之间不会感染, 这主要是由于家蝇先天性免疫产生抗菌肽的结果。家蝇易养殖、成本低, 是研究抗菌肽很好的资源之一, 故从蝇及其幼虫中提取抗菌肽及利用基因工程研制肽类抗生素越来越受到人们关注。据此, 笔者对家蝇抗菌肽及其基因工程研究进展进行综述, 旨在为今后抗菌肽的研究提供基础资料。

1 家蝇抗菌肽分类、生物学特性及作用机理

自分离出第一个抗菌肽天蚕素以来, 人们又相继从其他昆虫和哺乳动物、两栖动物、植物、微生物及鱼、软体动物、甲壳类动物中发现具有相似结构的抗菌肽。迄今为止, 在生物体内发现的抗菌肽已超过 2 000 种, 昆虫抗菌肽已多达 200 多种^[3]。

1.1 家蝇抗菌肽的分类 大多数家蝇抗菌肽属阳离子多肽, 由小于 100 个的氨基酸组成, 分子量少于 5 kD, 一级结构差别显著。其分类方法众多, 根据生物学特性可分为抗细菌肽、抗病毒肽、抗真菌肽、抗肿瘤肽和抗原虫肽 5 大类; 根据分子结构特点和氨基酸的组成, 家蝇抗菌肽又可分为 4 大类: ①天蚕素类(cecropin), 分子内含两性 α -螺旋, 线性, 包含 29~42 个氨基酸, 无半胱氨酸残基, 在 1, 2 位上多是色氨酸,

C-末端酰胺化; ②防御素类(defensin), 分子内形成像束束夹 β -折叠或 α -螺旋和 β -折叠混合的二硫键结构, 包含 33~46 个氨基酸, 分子内含 3~4 对二硫桥结构起稳定作用; ③富含脯氨酸的肽, 如 MDL-1, 线性结构, 包含 14~39 个氨基酸, 分成 2 个家族, 短链(< 20 个氨基酸)和长链(> 20 个氨基酸)^[4-5]; ④富含甘氨酸的肽, 如 attacin、MDL-2、MDL-3, 分子量 $0.8 \sim 3.0 \times 10^4$, 其共同特点是在一级结构中均含甘氨酸, 有的在全序列中含甘氨酸^[6]。

1.2 家蝇抗菌肽的生物学特性及作用机理 家蝇抗菌肽抗菌谱广、抗菌活性强, 且对病毒、真菌、肿瘤细胞、原虫均有不同程度的杀伤抑制作用, 同时还能加速免疫和伤口愈合过程^[7]。学者普遍认为抗菌肽杀菌机制主要是通过静电作用吸附到带负电荷的细菌细胞膜, 从而破坏胞膜结构, 细胞内钾、镁离子和其他内容物外流, 电化学势能平衡被破坏, 细胞因结构破坏, 代谢停止, 功能丧失发生不可逆变性而死亡。然而对病毒、真菌、肿瘤细胞、原虫则是通过作用于靶目标的细胞壁、细胞器或细胞内 DNA/RNA 起到生物学效应的, 但对其具体过程及是否存在特异性膜受体、协同因子等问题仍不清楚, 用单一的理论来解释它的作用机制颇受争论, 故目前多倾向联合多种理论来解释。

唐亚丽^[7]利用抗菌肽与细菌细胞的吸附结合特性分离出 2 种新的家蝇抗菌肽, 定名为 MDpep5 和 MDpep9, 试验表明它们对大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、枯草杆菌与金黄色葡萄球菌均有抗菌活性, 而且发现细菌细胞壁是抗菌肽作用的靶点, 同时也发现细菌细胞类型及抗菌肽结构差异也会影响肽与膜的相互作用, 甚至对于某些细菌, 在不造成其细胞壁膜损伤的前提下, 家蝇抗菌肽仍能影响其正常的生理功能造成细胞死亡。李金福等^[8]报道了用鸡胚培养法培养流感病毒并以家蝇幼虫血淋巴做抗病毒活性试验, 结果家蝇幼虫血淋巴具有抗病毒活性, 且初步估计抗菌物质是蛋白质或肽类。黄伟光^[9]通过免疫诱导家蝇幼虫分泌抗菌活性蛋白, 对

基金项目 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室开放课题(WSBKTKT201101)。

作者简介 王鑫(1980-), 男, 四川蓬溪人, 主治医师, 在读硕士研究生, 从事昆虫资源开发研究。* 通讯作者, 教授, E-mail: liuhui6032@sina.com。

收稿日期 2013-03-11

提取蛋白做抗菌试验表明其对白色念珠菌有明显抗菌作用,但未说明具体作用机制。贺莉芳等^[10]报道了家蝇幼虫抗菌蛋白对黑色素瘤 A₃₇₅ 细胞有明显的抑杀作用,流式分析表明其主要作用于细胞 S 期,但是否破坏细胞膜以及作用于膜内哪些细胞器还有待进一步研究。赵瑞君等^[11]报道了家蝇抗菌肽对弓形虫速殖子具有抑制作用,试验电镜图片显示加抗菌肽的弓形虫速殖子个体膨胀,表面凹凸不平,细胞即将崩解,而未加抗菌肽的对照组虫体完整,表面光滑,无大的形态变化,同时,虫体死亡速度随抗菌肽的量和时间呈正相关。随着现代各种疾病的滋生和蔓延以及超级“细菌”、“病毒”的出现,抗菌肽无疑是一把斩杀的利剑。

2 抗菌肽的表达调控

昆虫的免疫系统由细胞免疫和体液免疫组成的。由于缺乏适应性免疫,先天性免疫构成了所有多细胞生物抵御病原体入侵的第一道防线,而 NF- κ B 在宿主防御体系中扮演了主要角色。2 个识别和信号级联控制这种免疫反应:Toll 和 Imd(免疫缺陷)信号途径^[12],导致包括抗菌肽在内的多个免疫反应的基因的表达。果蝇是被证明是非常适合于研究先天性免疫和抵抗微生物感染的生物模型^[13],它的体液免疫应答受 2 个信号通道途径刺激,即 Toll 和 Imd,它们的激活也与不同类型的病原体有关。

Toll 信号途径主要介导大部分 G⁺ 菌和真菌感染的免疫应答,依赖酶解形成的肽氨基酸节细胞因子样蛋白而激活。当果蝇遭受外源菌入侵时,机体通过 PGRP-SA 和 GGBP-1 复合物与 PAMP 结合而触发淋巴液中一系列的酶解反应,Sp^{3/4} tztle 前体被丝氨酸蛋白酶水解产生激活型的 Sp^{3/4} tztle 蛋白^[14]。Toll 受体与激活的 Sp^{3/4} tztle 配体结合,导致胞内的 TIR 结构域与 Tube、Pelle 和 DmMyD88 形成多聚体,引起胞内信号级联反应,使 cactus 磷酸化而降解,从而释放出核转录因子进入细胞核调控相应抗菌肽的表达。近年来研究证实 1,25-(OH)₂-D₃ 也是一种重要的免疫调节剂,与 TLR 通路介导的固有免疫有重要的内在联系^[15-16]。

Imd 信号途径主要介导 G⁻ 菌感染的免疫应答,引起抗菌肽的产生(如双翅杀菌肽和一些免疫因子),从而消灭入侵的病原体。Imd 信号途径的激活需要 II 型跨膜受体 PGRP-LC 及其共同受体。PGRP-LC 包含 3 个亚型(PGRP-LCa、-LCx 和-LCy)。据报道,PGRP-LC 通过胞外域的 PGRP(肽聚糖识别蛋白)绑定独特的微生物模式识别分子如二氨基庚二酸肽聚糖(DAP-PGN)来识别 G⁻ 菌,但 PGRP-LC 的确切活化作用机制目前仍不清楚^[17]。通过对昆虫的系统研究,发现抗菌肽是主要的免疫效应因子,但其作用机制、表达调控等还需进一步深入研究。

3 家蝇抗菌肽的表达系统和克隆技术

3.1 抗菌肽的表达系统 天然抗菌肽来源有限,纯化困难,且化学合成成本太高,难以实现商品化,故通过基因工程来大规模生产抗菌肽是目前主要的发展方向。抗菌肽能否大量生产是影响抗菌肽应用的最大障碍,通过基因工程来大规模生产似乎是解决这一棘手问题的最佳途径,其中合适的表达系

统又显得尤为关键。抗菌肽表达系统主要有原核表达系统和真核表达系统,其中原核表达系统以大肠杆菌表达系统、枯草芽孢杆菌表达系统为代表,原核表达系统操作简便,但抗菌肽基因作为真核基因在原核系统中表达的蛋白往往不能有效正确的翻译,使得选择真核表达系统成为目前进行抗菌肽基因工程研究的热点。真核表达系统以酵母表达系统、杆状病毒表达系统和哺乳动物细胞表达系统为代表。抗菌肽的克隆技术虽然起步较晚,但随着分子生物学和遗传学的发展目前已日趋完善并多样化,常见的克隆技术有利用构建 cDNA、基因组 DNA 文库,应用现有核酸探针分离新的目的基因、RACE 技术、差别显示技术、差别分析法(RDA 法)、图位克隆技术、EST、同源序列法等。

3.2 家蝇抗菌肽的克隆及表达 家蝇细胞经诱导产生的抗菌肽主要由脂肪体合成,释放入血淋巴,流通浓度达总体值 0.5 mmol/L,这远高于体外杀死大多微生物所需浓度^[6]。然而传统方法提取抗菌肽成本高,且不易标准化,导致不能大规模生产,因此通过基因工程生产是大多数学者认同的研究方向。然而高效的表达系统是制约基因工程生产抗菌肽的重要因素。

3.2.1 原核表达。由于抗菌肽在原核表达系统中对宿主菌或细胞具有杀伤抑制作用,从而影响抗菌肽的进一步表达,故目前多采用融合表达的方式来生产抗菌肽。徐建华等^[18]从家蝇三龄幼虫中提取了其总 RNA,再利用 RT-PCR 扩增编码天蚕素 Cecropin 的 cDNA 序列,克隆入 T 载体 pUCm-T,然后以 pUCm-T/Cecropin 为模板,通过 PCR 方法扩增 Cecropin 成熟肽 cDNA 序列,克隆至融合表达载体 pGEX-4T-1 中,经筛选阳性重组子质粒转入不同的大肠杆菌宿主细胞中进行融合表达,最终经 SDS-PAGE 分析证明产物具有较强抗菌活性。金丰良等^[19]将家蝇死亡素基因和泛素基因构成嵌合基因,克隆到表达载体 pET-32a,再与硫氧还蛋白融合后构建表达载体 pET-TRX-UBI-THA,然后将酶切和测序鉴定正确的质粒转化表达宿主菌 BL21,SDS-PAGE 和 Western Blot 检测表明泛素融合技术可高效表达可溶性的死亡素。

3.2.2 真核表达。近年来由于原核表达系统目标蛋白往往得不到正确翻译,而且产量少,故利用真核表达系统生产抗菌肽愈来愈受到人们重视。酵母表达系统是常见的用于抗菌肽表达的真核表达系统,其能有效的转录和翻译外源基因,同时对合成的蛋白具有较好的加工和修饰功能。仇妍虹等^[20]将重组家蝇抗菌肽 Des-HF 克隆入酵母表达载体 pPIC-Za-A,构建了分泌型重组酵母表达载体 pPIC-Des-HF,然后将其转化 *Pichia pastoris* 受体菌 SMD1168,在醇氧化酶(AOX)启动子调控下,得到相对分子质量约 5 000 的重组抗菌肽 Des-HF,且通过抗菌试验检测产物具有生物活性。郭春和等^[21]也通过 SOEing-PCR 技术法合成了 CecropinD 基因序列,并克隆至酵母表达载体 pGAPZaA 中,构建重组表达质粒,将其线性化后电击转化毕赤酵母菌株 SMD1168 中得到成功表达。许琴英等^[22]将家蝇抗菌肽 Defensin 的真核表达载体转染 CHO(中国仓鼠卵巢细胞),通过 Ni-NTA 琼脂糖柱

层析纯化目的蛋白并以 Western 免疫印迹鉴定证明 Defensin 得到成功表达。

4 前景和展望

抗菌肽及其衍生物的出现无疑是对传统抗生素的变革,独特的生物学效应预示着它具有广阔的应用前景。随着临床抗生素的滥用,导致耐药菌株和超级细菌的出现,人们急需研发一类新型抗菌药物来解决这一棘手问题,其中抗菌肽备受青睐,有望成为摆脱困境的最佳替代药物。此外,抗菌肽的杀虫作用、对人体无毒副作用以及免疫调节功能等众多优点必将推动其在食品加工、畜牧业等领域的发展。然而由于抗菌肽天然资源有限,难以满足行业需求,故它的生产和提取成为制约发展的瓶颈,而基因工程似乎是开发抗菌肽的一条理想途径,但选择何种稳定、高效的表达系统仍是关键,并且如何提高蛋白纯化和临床应用也是需要解决的技术难题。随着对家蝇抗菌肽的研究越来越深入,相信在不久的将来其一定可以成为新一代肽类抗生素。

参考文献

[1] TIAN C, GAO B, FANG Q, et al. Antimicrobial peptide-like genes in *Nasonia vitripennis*: a genomic perspective[J]. BMC Genomics, 2010, 11: 187.

[2] 刘洁楠, 金永富. 舟山市家蝇对 5 种杀虫剂的抗性调查[J]. 浙江预防医学, 2012, 24(6): 22-23.

[3] TOKE O. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections[J]. Biopolymers, 2005, 80(6): 717-735.

[4] BULET P, HETRU C, DIMARCQ J L, et al. Antimicrobial Peptides in insects: structure and function[J]. Developmental and Immunology, 1999, 23(4-5): 329-344.

[5] BULET P, STOCKLIN R. Insect Antimicrobial Peptides: Structures, Properties and Gene Regulation[J]. Protein and Peptide Letters, 2005, 12: 3-11.

[6] 王义鹏, 赖仞. 昆虫抗菌肽结构、性质和基因调控[J]. 动物学研究, 2010, 31(1): 27-34.

[7] 唐亚丽. 家蝇抗菌肽的分离及对细菌壁膜和 DNA 的作用[D]. 江苏: 江南大学, 2009.

[8] 李金福, 陈艳. 家蝇幼虫血淋巴抗病毒作用初步观察[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(10): 981-983.

[9] 黄伟光. 蝇蛆蛋白的提取及其抗菌活性研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2011.

[10] 贺莉芳, 万启惠, 刘晖, 等. 家蝇幼虫抗菌蛋白诱导黑色素瘤 A₃₇ 细胞凋亡的探讨[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2006, 17(1): 20-22.

[11] 赵瑞君, 刘成芳, 董建臻, 等. 家蝇抗菌肽对弓形虫的抑制作用研究[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2005, 16(3): 189-190.

[12] HETRU C, HOFFMANN J A. NF- κ B in the Immune Response of *Drosophila*[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, 1(6): 1-15.

[13] VANHA-AHO L M, KLEINO A, KAUSTIO M, et al. Functional Characterization of the Infection-Inducible Peptide Edin in *Drosophila melanogaster*[J]. PLoS One, 2012, 7(5): 1-13.

[14] LIQOXYQAKIS P, PELTE N, HOFFMANN J A, et al. Activation of *Drosophila* Toll during fungal infection by a blood serine protease[J]. Science, 2002, 297(5578): 114-116.

[15] TOELL A, POLLY P, CARLBERG C. All natural DR3-type vitamin D response elements show a similar functionality in vitro[J]. Biochem J, 2000, 352: 301-309.

[16] WANG T T, NESTEL F P, BOURDEAU V, et al. Cutting edge: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression[J]. J Immunol, 2004, 173(5): 2909-2912.

[17] SCHMIDT R L, RINALDO F M, HESSE S E, et al. Cleavage of PGRP-LC receptor in the *Drosophila* IMD pathway in response to live bacterial infection in S2 cells[J]. Self Nonself, 2011, 2(3): 125-141.

[18] 徐建华, 朱家勇, 金小宝, 等. 家蝇幼虫抗菌肽天蚕素基因的克隆及其在大肠杆菌中融合表达[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(4): 311-318.

[19] 金丰良, 张呈文, 许小霞, 等. 死亡素与泛素在大肠杆菌中的高效融合表达[J]. 昆虫学报, 2009, 52(5): 495-501.

[20] 仇妍虹, 李鹏, 李斐, 等. 重组家蝇抗菌肽 Des-HF 在酵母中的表达及对金黄色葡萄球菌的抗菌活性[J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(1): 105-109.

[21] 郭春和, 焦茂兴, 何俊, 等. 抗菌肽 CecropinD 基因在毕赤酵母中的表达与抗菌活性分析[J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33(11): 858-886.

[22] 许琴英, 朱家勇, 金小宝, 等. 抗菌肽 Defensin 真核表达载体的构建及其在中国仓鼠卵巢细胞中的表达[J]. 中国生物医学工程杂志, 2011, 17(6): 509-512.

[23] 刘瑞, 孟华伟, 杨帆, 等. 家蝇消化腺抗菌肽生物活性的研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2011(03): 213-214.

[24] 费媛媛, 官晓炜, 周继章. 抗菌肽生物学功能及其应用的研究进展[J]. 湖南农业科学, 2012(8): 29-30, 33. [25] 范译文, 李吉平, 柴倩璞, 等. 抗菌肽的研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2012, 33(3): 29-31.

(上接第 4272 页)

[44] 宋珂珂. 玫瑰花黄酮提取分离及抗氧化性能研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2012.

[45] LOPEZ MDEL M, PEREZ M C, GARCIA M S, et al. Preparation, evaluation and characterization of quercetin-molecularly imprinted polymer for preconcentration and clean-up of catechins[J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 721: 68-78.

[46] ZHU T, LI S N, ROW K H. Molecularly Imprinted Monolithic Material for the Extraction of Three Organic Acids from *Salicornia herbacea* L[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2011, 121: 1691-1696.

[47] TAN J, LI M, LI R, et al. Functional monomer free synthesis of molecularly imprinted titania for solid-phase extraction of nicotinic acid[J]. Anal Methods, 2013, 5: 1245-1252.

[48] NICOLESCU T V, SARBU A, DIMA S O. Molecularly Imprinted Bulk Copolymers as Selective Sorbents for Gallic Acid[J]. J Appl Polym Sci, 2013, 127: 366-374.

[49] XIE J Q, CAI C Q, YANG H, et al. Synthesis and Application of Molecularly Imprinted Polymer on Selective Solid-Phase Extraction for the Determination of Artemisinin in *Artemisia annua* L[J]. Analytical Letters, 2013, 46: 107-119.

[50] 李小燕, 全海娟, 雷福厚. 青蒿素分子印迹聚合物分子识别性研究[J]. 中草药, 2012, 43(4): 795-798.

[51] JIA X P, XU M L, WANG Y Z, et al. Polydopamine-based molecular imprinting on silica-modified magnetic nanoparticles for recognition and separation of bovine hemoglobin[J]. Analyst, 2013, 138: 651-658.