

家蝇抗菌肽对细菌细胞表面特性影响及其作用机理的研究*

侯利霞¹ 翟培¹ 施用晖^{1,2} 唐亚莉¹ 乐国伟^{1,2,*}

(江南大学食品科学与技术国家重点实验室 无锡 214122) (江南大学食品学院 食品营养与安全研究所 无锡 214122)

摘要 利用微生物对十六烷吸附的方法(MATS方法)、微电泳方法与测定细菌质膜上 β -半乳糖苷酶活性的方法,探讨了家蝇抗菌肽对大肠杆菌等6种细菌细胞表面特性及其细胞膜的作用机制。研究结果表明,抗菌肽使细菌表面电负性增强,对 G^+ 细菌细胞表面电荷的改变大于对 G^- 的改变,使细菌细胞表面疏水性不同程度的下降。抗菌肽引起细菌细胞膜通透性迅速增加,不同细菌 β -半乳糖苷酶释放的最大速度 V_p 在3.86 pmol/min~6.92 pmol/min,相应的时间 T_p 为0,由此推测抗菌肽对细胞膜的作用机制是“形成孔洞”。

关键词 抗菌肽,家蝇(*Musca domestica*)细胞表面特性,细胞膜

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)03-0434-04

Effect on the Bacterial Cell Surface Characteristics and Cell Membrane of the Antibacterial Peptide of Housefly(*Musca domestica*)*

HOU Li-Xia¹ ZHAI Pei¹ SHI Yong-Hui^{1,2} TANG Ya-Li¹ LE Guo-Wei^{1,2,*}

(Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education, Wuxi 214122)

(Institute of Food Nutrition and Safety, School of Food Science, Southern Yangtze University, Wuxi 214122)

Abstract Effect on the bacterial cell surface characteristics and cell membrane of the antibacterial peptide of the larvae of housefly(*Musca domestica*) was studied by MATS, microelectrophoresis and measuring the hydrolysis of o-nitrophenyl-L-D-galactoside(ONPG) by the cell β -galactosidase. The results indicated that the antibacterial peptide of the housefly larvae could increase the negative charge of the cell surface, more potently to the G^+ than the G^- , and could decrease the hydrophobicity of the cell surface. The results also suggested that the antibacterial peptide could increase the permeability of the cell membrane, the regression equation of the time course of o-nitrophenol(ONP) was obtained, and the maximum velocity of ONPG hydrolysis(V_p) was calculated to be 3.86 pmol/min-6.92 pmol/min for various tested bacteria at 0 minute. It was suggested that the antibacterial peptide may act on the cell membrane through the “pore forming” mechanism.

Key words Antibacterial peptide, Housefly(*Musca domestica*), Cell surface characteristics, Cell membrane

昆虫抗菌肽是昆虫组成性表达或经诱导表达的一类相对分子质量较低的、广谱抗菌活性物质^[1]。家蝇(*Musca domestica*)从幼虫到成虫都生活在杂菌横生的污浊环境中,有着极强的适应恶劣环境的生存能力。一些研究者分别从家蝇中分离纯化得到抗菌肽。宫霞等^[2]、周义文等^[3]经电镜扫描观察到,细菌经家蝇抗菌肽作用其细胞膜出现破损和穿孔现象;关于昆虫抗菌肽对细菌的作用机制存在孔洞、离子通道、抑制细胞呼吸、抑制细胞壁形成

及可变毯模型学说^[4]等观点。研究家蝇抗菌肽对细菌细胞表面特性的影响及其细胞膜作用,有助于揭示抗菌肽的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 供试菌株,大肠杆菌 ATCC25922 (*Escherich coli* ATCC25922),鼠伤寒沙门氏菌 50013 (*Salmonella typhimurium* 50013),大肠志贺氏菌 51302

* 中国中央研究院基础科学专项基金(No. 2001DEA20022)资助。

** 通讯作者 Tel 0510-85917789, E-mail: yhshi@sytu.edu.cn

收稿日期:2006-07-05,修回日期:2006-10-08

(*Shigella dysenteriae* 51302), 金黄色葡萄球菌 6538 (*Staphylococcus aureus* 6538) 枯草杆菌 9372 (*Bacillus subtilis* 9372), 链球菌由由无锡市疾病预防控制中心提供, 大肠杆菌 JM109 (*Escherich coli* JM109, 抗氨苄青霉素的基因工程菌) 由本实验室保存, 均利用牛肉膏蛋白胨培养基培养。

1.1.2 材料与试剂: 家蝇抗菌肽为本实验室利用 G15 凝胶色谱和反相高压液相分离、纯化制备, 在 SDS-PAGE 显示为一条带, 分子量约为 8000D, 详见参考文献 [5]。邻硝基苯 β -D-半乳糖苷 (ONPG) 购于中国科学院上海生化所, TritonX-100 为华美生物工程公司产品。

1.1.3 仪器: Multiskan MK3 酶联免疫检测仪 (美国 Thermo 公司); HYG-A 型恒温调速摇床 (江苏太仓市实验设备厂); PYX-DHS 隔水式电热恒温培养箱 (上海跃进医疗器械厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 家蝇幼虫抗菌肽对细菌细胞表面特性的影响 (1) 抗菌肽对细菌细胞表面电荷的影响参照 Pelletier^[6] 进行, 静止生长期的细菌与亚致死浓度的抗菌肽于 37℃ 共孵育 1h, 在室温下用 Zetameter model 电泳仪测量细菌电泳运动率 (EM, 单位 $10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), 作为细菌细胞表面电荷指标, 电场电压 100V。(2) 抗菌肽对细菌细胞表面疏水性的影响, 参照 Pelletier^[6] MATS 方法进行, 实验重复两次。

1.2.2 抗菌肽对细菌细胞内膜渗透性检测, 参照文献 [7] 的方法进行。

2 结果

2.1 家蝇幼虫抗菌肽对细菌细胞表面特性的影响

2.1.1 家蝇抗菌肽对细菌细胞表面电荷的影响 抗菌肽与细菌细胞表面作用是抗菌肽与细菌接触、作用的第一步。从图 1 可以看出, 抗菌肽处理后细菌表面电负性增强, 其中大肠杆菌 ATCC25922 由对照的 -0.873 电负性增加到 -1.52, 链球菌由对照的 -2.451 电负性增加到 -2.863, 金黄葡萄球菌由对照的 -1.862 电负性增加到 -2.787; 只有大肠杆菌 JM109 的电负性轻微减少, 由对照的 -3.486 电负性减少到 -3.412。并且结果表明家蝇抗菌肽对 G^+ 细菌细胞表面电荷的改变大于对 G^- 的改变。

2.1.2 家蝇抗菌肽对细菌细胞疏水性的影响 抗菌肽作用于细菌后, 细菌细胞表面疏水性均有不同程

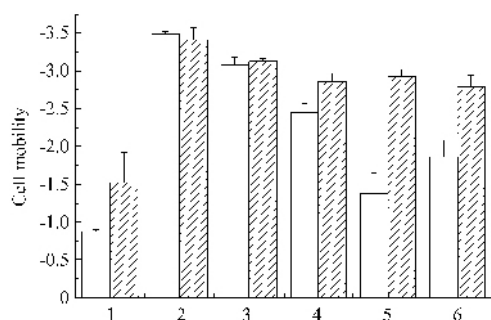


图 1 家蝇幼虫抗菌肽对细菌细胞表面电荷的影响

1 大肠杆菌 ATCC25922 2 大肠杆菌 JM109 3 志贺氏菌 51302 4 链球菌 5 鼠伤寒沙门氏菌 50013 6 金黄色葡萄球菌 6538

□ CK ▨ 抗菌肽处理

度的下降。在抗菌肽处理后大肠杆菌 ATCC 25922 与志贺氏菌 51302 疏水性分别为 34.57 和 54.32, 分别比对照下降 20.91% 和 13.05%, 链球菌的疏水性变化最小, 下降 0.98% (图 2)。

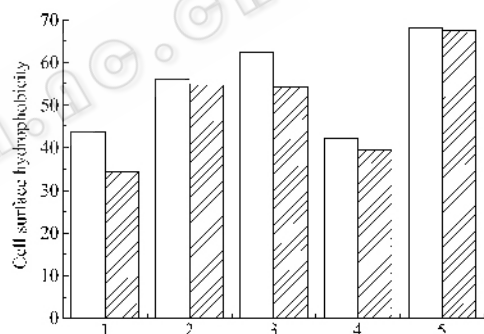


图 2 家蝇抗菌肽对细菌细胞疏水性的影响

1 大肠杆菌 ATCC25922 2 大肠杆菌 JM109, 3 志贺氏菌 51302, 4 链球菌 5 鼠伤寒沙门氏菌 50013

□ CK ▨ 抗菌肽处理

2.2 抗菌肽对细菌细胞膜作用分析

细菌在受到乳糖诱导后均可产生 β -半乳糖苷酶, β -半乳糖苷酶是位于细菌细胞质膜上的水解酶, 能使乳糖水解成半乳糖和葡萄糖。邻硝基苯 β -D-半乳糖苷 (ONPG) 是乳糖的替代物, β -半乳糖苷酶可以将 ONPG 水解成半乳糖和黄色的邻-硝基苯酚, 因此可以通过培养液颜色的变化测知 β -半乳糖苷酶的活性。若细胞膜的结构遭到破坏, 细胞膜的通透性改变, β -半乳糖苷酶释放到细胞外或邻硝基苯 β -D-半乳糖苷 (ONPG) 进入到细胞内部, 使反应体系 OD 值快速升高, 因此利用 β -半乳糖苷酶对 ONPG 的水解来检测抗菌肽对细菌细胞膜通透性的影响。

从图 3~8 可以看出, 家蝇幼虫抗菌肽可以引起

细菌细胞膜通透性迅速增加,120 min 时大肠杆菌 ATCC25922,大肠杆菌 JM109,鼠伤寒沙门氏菌 50013,大肠志贺氏菌 51302,金黄色葡萄球菌 6538,链球菌的 $OD_{405\text{nm}}$ 由 0.25 左右分别增加到 1.085, 1.208, 0.745, 1.846, 0.775 和 1.085;当 $MgCl_2$ 存在时,抗菌肽对细菌细胞膜的作用减弱,特别是对 G⁻细菌,但仍然使邻硝基苯 β -D 半乳糖苷(ONPG)增加。

利用统计软件 SPSS 对抗菌肽作用后体系的吸光度与时间进行相关性分析,细胞膜通透性的影响结果如下:

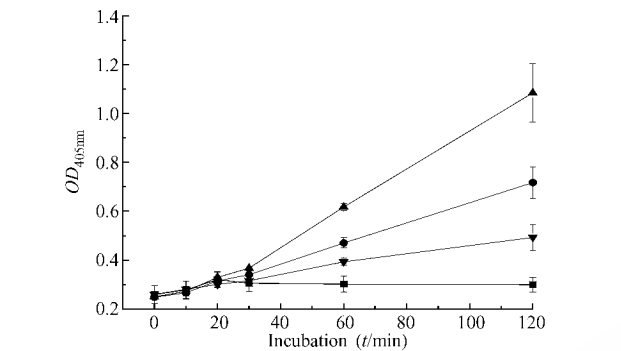


图 3 抗菌肽对大肠杆菌膜通透性的影响
—■— NAPB(CK); —●— TritonX-100(CK), —▲— 抗菌肽处理, —▼— 抗菌肽与 $MgCl_2$ 处理

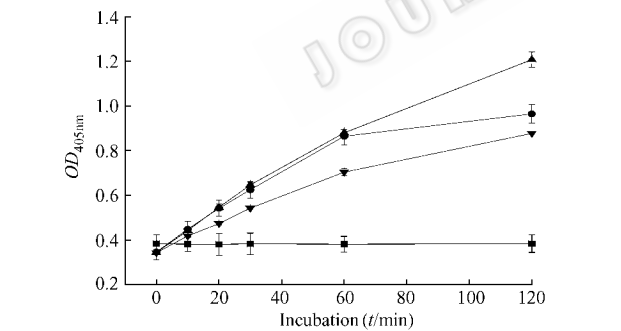


图 4 抗菌肽对大肠杆菌 JM109 膜通透性的影响,
—■— NAPB(CK); —●— TritonX-100(CK), —▲— 抗菌肽处理, —▼— 抗菌肽与 $MgCl_2$ 处理

表 1 抗菌肽对微生物细胞膜通透性影响		
微生物	回归方程	相关系数
链球菌	$Y = 0.13 + 0.00682X$	($R = 0.903^*$)
金黄色葡萄球菌	$Y = 0.165 + 0.00451X$	($R = 0.939^*$)
志贺氏菌	$Y = 0.179 + 0.00413X$	($R = 0.925^*$)
大肠杆菌 ATCC25922	$Y = 0.198 + 0.00722X$	($R = 0.994^*$)
沙门氏菌	$Y = 0.215 + 0.00740X$	($R = 0.997^*$)
大肠杆菌 JM109	$Y = 0.392 + 0.00714X$	($R = 0.990^*$)

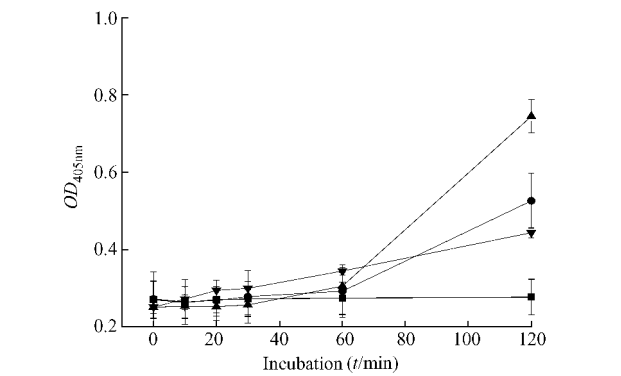


图 5 抗菌肽对志贺氏菌膜通透性的影响
—■— NAPB(CK); —●— TritonX-100(CK), —▲— 抗菌肽处理, —▼— 抗菌肽与 $MgCl_2$ 处理

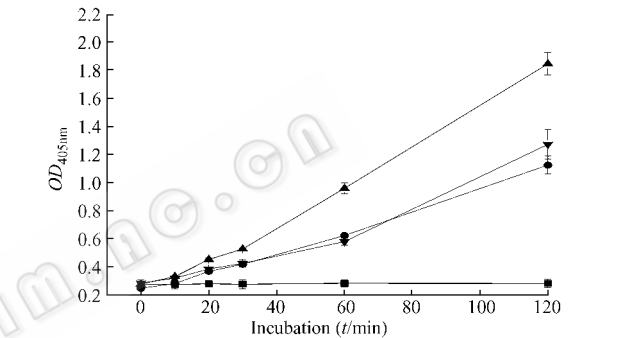


图 6 抗菌肽对沙门氏菌膜通透性的影响
—■— NAPB(CK); —●— TritonX-100(CK), —▲— 抗菌肽处理, —▼— 抗菌肽与 $MgCl_2$ 处理

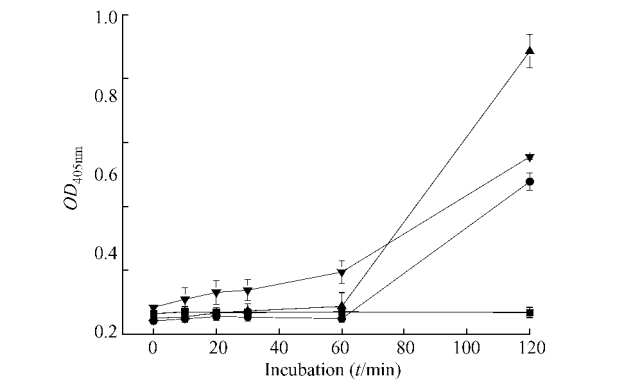


图 7 抗菌肽对链球菌膜通透性的影响
—■— NAPB(CK); —●— TritonX-100(CK), —▲— 抗菌肽处理, —▼— 抗菌肽与 $MgCl_2$ 处理

利用($A_{415} \times 1000/\text{样品体积}$)(反应时间 $\times 4.86$)计算 β -半乳糖苷酶的释放^[10],式中 A_{415} 为反应后体系在 415nm 的吸光度,在本实验中以 A_{405} 近似代替 A_{415} 4.86 为硝基酚(ONP)的消光系数($\text{mmol/L} \cdot \text{cm}^{-1}$),样品体积与反应时间的单位分别为 μL , min,并代入 $Y = b_0 + b_1x$ 分别对 Y 求一阶导数与二

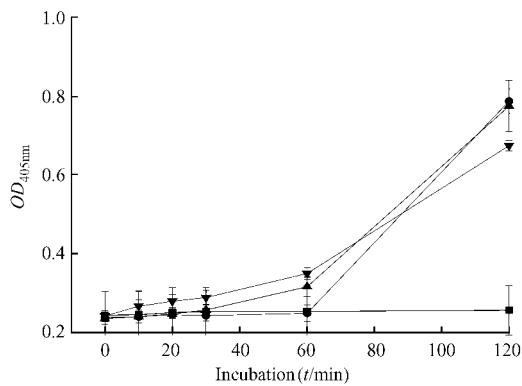


图 8 抗菌肽对金黄色葡萄球菌膜通透性的影响

■—NPB(CK) ; ●—TritonX-100(CK) ; ▲—抗菌肽处理 , ▼—抗菌肽与 MgCl₂ 处理

阶导数 ,可以得到 β -半乳糖苷酶释放的最大速度 V_p 与相应的时间 T_p ,结果见表 1。

表 2 家蝇抗菌肽对不同细菌细胞膜渗透性的影响

细菌	V_p (pmol/min)	T_p (min)
志贺氏菌	3.68	0
金黄色葡萄球菌	4.22	0
链球菌	6.37	0
大肠杆菌 JM109	6.68	0
大肠杆菌 ATCC25922	6.75	0
鼠伤寒沙门氏菌	6.92	0

抗菌肽作用于细菌细胞膜 ,使细胞膜的渗透性瞬间达到最大 ,此后保持渗透速度不变 ,由此可以推测家蝇幼虫抗菌肽对细胞膜的作用机制是“ 形成孔洞 ”。

3 讨论

抗菌肽与细菌表面相接触是抗菌肽作用于细菌的第一步 ,从而影响细菌的表面特性 ,细菌的表面特性主要包括表面电荷与表面疏水性。细菌细胞表面结构复杂 ,同时存在有亲水性位点和疏水性位点。亲水性位点主要是带电荷的基团 ,例如羧基或磷酸基团、氨基或胍基基团与不带电荷的羟基基团 ,疏水性位点主要是脂类、脂多糖与蛋白质。

本研究中家蝇幼虫抗菌肽处理后细菌表面电负性增强 ,细菌细胞表面疏水性均有不同程度的下降。推测是由于阳离子的家蝇抗菌肽与细菌表面相互作用 ,吸引带负电荷的基团趋向表面分布重排 ,从而导致细菌表面电负性增强及表面疏水性下降。念珠菌在抗真菌药剂制霉菌素 ,氟康唑作用后细菌表面疏水性下降^[8]。这是首次关于抗菌肽对细菌细胞表面特性作用的研究报道。

本研究结果表明 ,家蝇幼虫抗菌肽可以增加细菌细胞膜上 β -半乳糖苷酶的释放 ,即细胞膜的通透性 ,当 MgCl₂ 存在时 ,减弱了抗菌肽对细胞膜的作用。这可能是由于 Mg²⁺ 增强了细菌细胞壁中组分肽聚糖、磷壁酸及脂多糖的交联与折叠 ,这同时说明细菌细胞壁的结构会在一定程度影响抗菌肽对细胞膜的作用 ,但细胞膜是家蝇幼虫抗菌肽的主要作用位点。本研究对抗菌肽作用后细胞膜上 β -半乳糖苷酶的释放进行回归模型分析并进行求导 ,得到了 β -半乳糖苷酶释放的最大速率与相应的时间 ,由此可以推测家蝇幼虫抗菌肽对细胞膜的作用机制是“ 形成孔洞 ”。目前测定抗菌肽对膜作用机制的途径主要包括高倍电镜观察、核磁共振分析与荧光光谱分析 ,与这些技术相比 ,本研究提供了一种更便捷、直接的手段 ,我们将在以后的研究中对此方法进行进一步的完善。

参考文献

[1] 王远程 ,孙东旭 . 微生物学通报 ,1994 ,21(5) :290 ~ 292 .
[2] 宫 霞 ,乐国伟 ,施用晖 ,等 . 昆虫学报 ,2004 ,47(1) :8 ~ 13 .
[3] 周义文 ,尹一兵 ,涂植光 ,等 . 中国抗生素杂志 ,2004 ,29(5) :272 ~ 274 .
[4] 徐进署 ,张双全 . 昆虫学报 ,2002 ,45(5) :673 ~ 678 .
[5] Hou L ,Shi Y ,Zhai P ,et al . Food control ,2006 ,in press ;
[6] Pelletier C ,Bouley C ,Cayuela C ,et al . Applied and environmental microbiology ,1997 ,63(5) :1725 ~ 1731 .
[7] Ibrahim H R , Sugimoto Y , Aoki T . Biochimica et Biophysica Acta , 2000 ,1523 :196 ~ 205 .
[8] Ellepola A N B , Samaranyake L P . Archives of Oral Biology ,1998 ,43 : 879 ~ 887 .