

研究报告

天蚕素 A-马盖宁杂合肽对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌抑菌机制的研究

刘二强¹ 陈香君¹ 回丽媛¹ 朱明星² 王秀青^{1*}

(1. 宁夏医科大学检验学院 宁夏 银川 750004)

(2. 宁夏医科大学科技中心 宁夏 银川 750004)

摘要:【目的】研究天蚕素 A-马盖宁杂合肽对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA) DNA 作用的抑菌机制。【方法】利用激光扫描共聚焦显微镜(CLSM)、凝胶阻滞分析、紫外光谱分析、荧光光谱分析的方法。【结果】天蚕素 A-马盖宁杂合肽对 MRSA 的最小抑菌浓度(MIC)为 64 mg/L, 杂合肽可以在细菌胞内形成累积, 并能与体外基因组 DNA 发生结合作用。同时杂合肽可以引起 DNA 构象的改变, 荧光光谱分析结果表明杂合肽能与溴化乙锭(EB)竞争性地嵌入基因组 DNA 中, 作用方式类似于 EB 与 DNA 的结合方式, 杂合肽与 DNA 的结合表现为混合式作用方式。【结论】天蚕素 A-马盖宁进入细菌胞内, 与 MRSA 基因组 DNA 结合, 并以混合式作用方式与 DNA 发生了结合, 通过胞内靶向机制发挥抑菌作用。

关键词: 天蚕素 A-马盖宁, 杂合肽, 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌, 作用机制

Inhibition of MRSA by hybrid peptides of CecropinA-Magainins

LIU Er-Qiang¹ CHEN Xiang-Jun¹ HUI Li-Yuan¹
ZHU Ming-Xing² WANG Xiu-Qing^{1*}

(1. Institute of Clinical Laboratory of Medicine of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

(2. Science and Technology Center of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

Abstract: [Objective] To investigate the antimicrobial mechanism of DNA action of CecropinA-Magainins treatment on the Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). [Methods] The mechanism was analyzed by Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM), Gel shift Assay, Ultraviolet Spectrum Analysis and Fluorescence Spectrum Analysis. [Results] The results demonstrated that the minimal inhibitory concentration (MIC) of the peptide against MRSA was 64 mg/L. The hybrid peptide could accumulate within the bacterial cell, and bind with the genomic DNA *in vitro*. Meanwhile, the hybrid peptide caused the change of DNA conformation. The results of Fluorescence Spectrum Analysis showed that the hybrid peptide competitively embedded genomic

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31360622)

***Corresponding author:** Tel: 86-951-4083334; E-mail: xiuqingwang1979@163.com

Received: July 28, 2015; **Accepted:** September 08, 2015; **Published online** (www.cnki.net): October 08, 2015
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31360622)

***通讯作者:** Tel: 86-951-4083334; E-mail: xiuqingwang1979@163.com

收稿日期: 2015-07-28; **接受日期:** 2015-09-08; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-10-08

DNA with EB, and its combination mode was similar to the mode of EB and DNA. Finally, we found the combination mode of hybrid peptide and DNA was mixed mode. **[Conclusion]** CecropinA-Magainins can enter into the bacterial cell, bind with the genomic DNA. The hybrid peptide kills bacteria via intracellular-targeting mechanism.

Keywords: CecropinA-Magainins, Hybrid peptides, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Mechanism of action

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)在金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)感染中所占的比例越来越高,部分地区高达70%以上^[1],已经成为医院感染的重要致病菌之一。而MRSA对常用抗菌药物具有较高的耐药率,成为MRSA感染临床治疗的难点。因此寻求新型有效的抗菌药物,成为目前解决MRSA感染问题的有效途径之一。

抗菌肽(Antimicrobial peptides, AMPs)是广泛存在于生物体内,由特定基因编码产生,具有抵御外界微生物侵害及清除体内突变细胞作用的一类小分子多肽,是生物天然免疫防御系统的重要组成部分^[2-3]。抗菌肽对细菌和真菌具有广泛的抑菌效果,又因其不容易产生耐药性而显示出强大的抗菌应用前景。天蚕素A-马盖宁是由抗菌作用较强的两种阳离子小肽——天蚕素A(CecropinA)和马盖宁(Magainins)杂合而成。研究者前期选用了天蚕素A成熟肽段1-7以及马盖宁2-12的氨基酸序列,杂合肽的体外试验显示,其对G⁺及G⁻菌均具有良好的抑菌效果,对临床分离出的MRSA菌株也有良好的抑杀活性^[4]。目前抗菌肽的抑菌机制有两种假说:(1)抗菌肽作用位点在细菌细胞膜,通过破坏细胞膜,改变细胞膜的通透性,引起胞内物质泄漏,引起细菌死亡;(2)抗菌肽进入细菌胞内,与细菌胞内物质发生相互作用,干扰细菌代谢功能,导致细菌死亡。课题组前期进行了抗菌肽对MRSA细胞膜作用机制的研究^[5],结果表明天蚕素A-马盖宁杂合肽可以破坏MRSA细胞膜,引起细胞外钾离子浓度的升高,电镜观察细菌内部成分发生了变化。因此本研究在前期研究的基础上,进一步研究杂合肽能否进入细菌胞内,以及能否与细菌基因组DNA发

生相互作用,引起细菌死亡的机制。我们拟通过激光扫描共聚焦显微镜观察杂合肽能否进入细菌,通过凝胶阻滞实验判断杂合肽与MRSA基因组DNA的结合能力,并利用紫外光谱分析观察杂合肽是否引起DNA分子构象的变化。溴化乙锭(EB)可以嵌入DNA碱基对中,其与DNA的结合几乎没有碱基序列特异性。在饱和的EB溶液中,大约每2.5个碱基插入一个溴化乙锭分子。当染料分子插入后,其平面基团与螺旋的轴线垂直并通过范德华力与上下碱基相互作用^[6]。杂合肽与基因组DNA是否存在这样的结合方式呢?我们通过荧光光谱分析来研究杂合肽与DNA的结合方式,并获得杂合肽与DNA的结合常数和成键位点数。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 天蚕素A-马盖宁杂合肽:未标记FITC的杂合肽由上海楚肽生物科技有限公司合成, Purity (HPLC)纯度≥95%。FITC标记的杂合肽(FITC-肽)由生工生物工程(上海)股份有限公司采用固相化学合成法合成, Purity (HPLC)纯度≥95%。ddH₂O作为溶解杂合肽的溶剂, 0.22 μm滤器过滤^[7]。

1.1.2 菌种:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)菌株为临床菌株,由宁夏医科大学总医院实验中心提供。

1.1.3 主要试剂和仪器:MH培养基,购自英国OXOID公司;细菌基因组DNA提取试剂盒,购自美国Omega公司;PowerPacTM Basic基础电泳仪、Universal Hood II电泳凝胶成像分析系统,购自美国Bio-Rad公司;Olympus FV1000激光扫描共聚焦荧光显微镜,购自日本Olympus公司;岛津UV2550

可见紫外分光光度计, 购自日本岛津公司; 970CRT 荧光分光光度计, 购自上海精密科学仪器有限公司。

1.2 杂合肽对 MRSA 的最小抑菌浓度(Minimal inhibitory concentration, MIC)的测定

测定 MIC 值采用微量肉汤稀释法, 参照 CLSI (Clinical laboratory standards institute)指南^[8]。取 MRSA 保存液 10 μ L 加入 1 mL MH 培养基, 置于 35 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养过夜, 紫外分光光度计测定 OD_{600} 值, MH 培养基调整菌液浓度至 1×10^5 CFU/mL。向 96 孔培养板中加入 100 μ L 经倍比稀释的杂合肽溶液, 使各孔中杂合肽浓度分别为 1 024、512、256……2、1 mg/L, 再加入 100 μ L 上述菌液, 终体积为 200 μ L。以 MH 培养基作为阴性对照, 稀释后菌液作为阳性对照。35 $^{\circ}$ C 培养 22 h, 酶标仪在 600 nm 波长下检测 OD 值。将 OD 值不再有显著变化的最小浓度定义为抗菌肽对 MRSA 的最低抑菌浓度。实验重复 3 次, 计算平均值。

1.3 激光扫描共聚焦显微镜(CLSM)观察杂合肽在 MRSA 细胞内的累积

收集对数生长期 MRSA 菌液, 5 000 \times g 离心 5 min, 用 ddH₂O 清洗 3 遍, 以浓度为 MIC 值的 FITC-肽溶液重悬菌液浓度至 1×10^8 CFU/mL。置于生化培养箱中 37 $^{\circ}$ C、避光孵育不同时间。5 000 \times g 离心 5 min 弃上清, 收集菌沉淀, 用 ddH₂O 洗 3 遍后重悬。吸取 5 μ L 重悬液均匀涂布在干净的载玻片上, 4%多聚甲醛室温固定, 加入防荧光淬灭封片剂后, 盖上盖玻片, 封边剂固定盖玻片^[9]。激光扫描共聚焦显微镜(目镜 \times 60 倍, Zoom \times 3, NA 值 1.24), 观察抗菌肽在细胞内的累积。激发波长为 488 nm, 观察细菌在 495 nm 波长的发射光^[10]。

1.4 杂合肽与 MRSA 作用后对基因组 DNA 的影响

1.4.1 MRSA 基因组 DNA 的提取: 参照 Omega Bacterial DNA Kit 提取试剂盒说明书进行, 测定 MRSA 的基因组 DNA, 纯度符合试验要求 $1.80 \leq OD_{260}/OD_{280} \leq 2.00$ 。

1.4.2 凝胶阻滞实验观察杂合肽与基因组 DNA 的结合: 基因组 DNA (300 ng 10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)与不同浓度梯度的杂合肽混合至终体积为 10 μ L, 37 $^{\circ}$ C 避光温浴 15 min。加入 2 μ L Loading buffer (6 \times Loading dye, Toyobo, Osaka)。1.2%的琼脂糖凝胶电泳, 电压 110 V, 电泳时间 45 min, 电泳凝胶成像分析系统观察。

1.4.3 杂合肽对 MRSA 基因组 DNA 作用的紫外光谱分析: 以 ddH₂O 作为溶剂溶解 DNA 样本和杂合肽。将 MRSA 基因组 DNA 与不同浓度梯度的杂合肽溶液混合, 使各测试组基因组 DNA 的终浓度均为 30 mg/L。混匀后, 置于生化培养箱中 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 20 min。等体积的 ddH₂O 作为阴性对照组。紫外可见分光光度计扫描 220–320 nm 波长下的吸光度值, 扫描速度 800 nm/min, 采样间隔 1 nm, 中度响应速度。测量时间不超过 3 min^[11]。

1.4.4 荧光光谱法分析杂合肽与 MRSA 基因组 DNA 的结合: 利用荧光分光光度计, 测定杂合肽与基因组 DNA 的结合^[12]。以 ddH₂O 作为溶剂, 将不同浓度梯度的杂合肽溶液与基因组 DNA 混合, 使基因组 DNA 的终浓度保持为 30 mg/L。混匀后, 置于生化培养箱中 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 20 min。等体积的 ddH₂O 作为阴性对照组。狭缝设置为 $E_x=E_m=5$ nm, 设定荧光激发波长 $\lambda_{ex}=360$ nm, 测定荧光发射波长 $\lambda_{ex}=550-750$ nm 范围的荧光光谱。

1.4.5 杂合肽对 EB-DNA 复合体系滴定的荧光光谱分析: 基因组 DNA 与 20 mg/L 的 EB 溶液混合, 避光放置 10 min, 再加入不同梯度浓度的抗菌肽溶液, 保持基因组 DNA 的终浓度为 30 mg/L。充分混匀后, 置于生化培养箱中 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 20 min。等体积的 ddH₂O 作为阴性对照组^[13]。狭缝设置为 $E_x=E_m=5$ nm, 设定荧光激发波长 $\lambda_{ex}=360$ nm, 测定荧光发射波长 $\lambda_{ex}=550-750$ nm 范围的荧光光谱^[14]。

1.4.6 EB 对杂合肽-DNA 复合体系滴定的荧光光谱分析: 基因组 DNA 与 50 mg/L 的杂合肽溶液混合, 避光放置 10 min, 再加入不同浓度梯度的 EB

溶液,保持基因组 DNA 的终浓度保持为 30 mg/L。充分混匀后,置于生化培养箱中 37 °C 避光孵育 20 min。等体积的 ddH₂O 作为阴性对照组^[15]。狭缝设置为 $E_x=E_m=5$ nm,设定荧光激发波长 $\lambda_{ex}=360$ nm,测定荧光发射波长 $\lambda_{em}=550-750$ nm 范围的荧光光谱。

2 结果与分析

2.1 杂合肽对 MRSA 的 MIC 值的测定

杂合肽对 MRSA 的抗菌活性以最低抑菌浓度 (MIC)来表示。实验结果为杂合肽浓度稀释到终浓度为 64 mg/L 时,波长 600 nm 处的吸光度值不再变化。因此杂合肽天蚕素 A-马盖宁对 MRSA 的 MIC 值为 64 mg/L。

2.2 激光扫描共聚焦显微镜(CLSM)杂合肽在 MRSA 细胞内的累积

我们前期在杂合肽天蚕素 A-马盖宁对 MRSA 杀菌机制的研究中发现,杂合肽能够引起 MRSA 细胞膜渗透性的改变,破坏细胞膜的完整性。为了观察杂合肽能否进入细菌胞内、发挥胞内作用及杀伤

细胞的过程,研究采用 FITC 荧光标记偶联杂合肽,通过 CLSM 在 488 nm 波长激发光激发下,观察杂合肽在 MRSA 胞内的累积。由图 1、2 可知,浓度为 MIC 的 FITC-肽与 MRSA 作用 10 min 后,有比例为 32.2%的细菌出现了荧光,即说明 MRSA 在杂合肽处理 10 min 后,有 32%的细菌胞内出现了杂合肽的累积。而杂合肽作用 MRSA 30 min 后,杂合肽进入细菌胞内的比例更高(71.4%),荧光强度更强,说明随着处理时间的延长,更多的杂合肽进入细菌胞内,在短时间内实现了在细菌胞内的累积。

2.3 杂合肽与 MRSA 作用后对基因组 DNA 的影响

2.3.1 凝胶阻滞实验观察杂合肽与基因组 DNA 的结合: 杂合肽进入细菌胞内后,能否与胞内的生物大分子,尤其是与细菌的 DNA 发生作用,影响细菌的生命活动,进而导致细菌死亡? 为此我们提取了细菌基因组 DNA 后,进行了体外实验,研究杂合肽能否与 DNA 发生相互作用。通过凝胶阻滞实

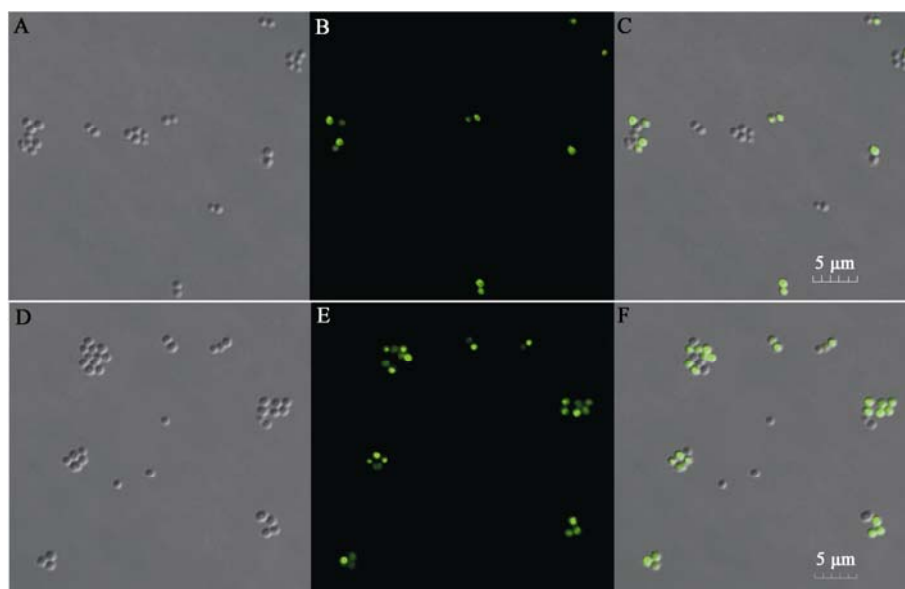


图 1 激光扫描共聚焦显微镜观察 FITC-肽在 MRSA 中的累积

Figure 1 LSCM images of MRSA reacted with FITC-peptide

注: A: 作用 10 min 明场图; B: 作用 10 min 荧光图; C: 作用 10 min 叠加图; D: 作用 30 min 明场图; E: 作用 30 min 荧光图; F: 作用 30 min 叠加图。

Note: A: The bright field image treated 10 min; B: Fluorescence image treated 10 min; C: The merged image treated 10 min; D: The bright field image treated 30 min; E: Fluorescence image treated 30 min; F: The merged image treated 30 min.

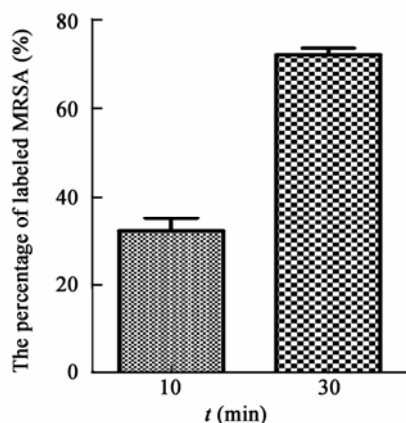


图2 FITC 标记阳性的 MRSA 百分比

Figure 2 The percentage of labeled MRSA by FITC

验结果,发现杂合肽与 MRSA 基因组 DNA 有很强的结合能力(图 3)。由于天蚕素 A-马盖宁杂合肽与 DNA 强烈的结合作用,导致复合物分子量增大,并且随加入杂合肽的浓度增大而增大,电泳过程中, DNA 向正极移动的速度减慢,迁移速率下降,因此在凝胶中呈现阻滞现象。实验结果显示,当杂合肽与 DNA 的质量比为 1 时(泳道 4),即出现明显阻滞现象,而当质量比为 6 时(泳道 7),杂合肽与 DNA 发生强烈的结合,复合物分子量增大到致使 DNA 无法跑出点样孔。

2.3.2 杂合肽对 MRSA 基因组 DNA 作用的紫外光谱分析: DNA 分子在紫外区 260 nm 处有强吸收峰,当杂合肽与 DNA 分子发生作用后会引引起光谱特征

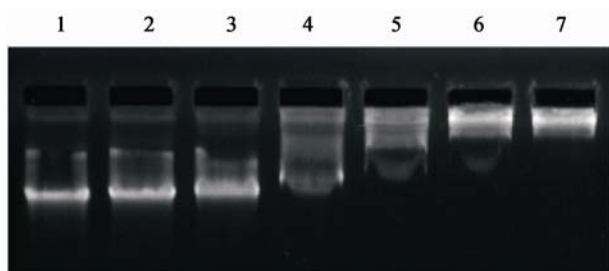


图3 杂合肽与 DNA 结合的凝胶阻滞分析

Figure 3 Gel retardation assay of DNA-peptides binding

注: 1-7 号泳道杂合肽浓度分别为 0、6、15、30、60、120、180 mg/L。

Note: The concentration of hybrid peptide in lane 1-7 respectively is 0, 6, 15, 30, 60, 120, 180 mg/L.

的变化,因此可以用紫外可见光谱分析杂合肽与基因组 DNA 的作用。小分子物质与 DNA 分子发生作用后,会引起光谱的变化,导致吸光度值升高或降低,以及最大吸收波长的红移和蓝移。本实验中,不同浓度梯度的杂合肽与基因组 DNA 作用后,随着杂合肽浓度的增大,波长 260 nm 处紫外吸收值不断变小,光谱发生了减色效应(图 4),这可能是由于杂合肽嵌插到了 DNA 的碱基对中,减色效应越明显说明与 DNA 的结合作用越强,进而改变了 DNA 的构象。杂合肽与细菌基因组 DNA 的紫外光谱分析表明杂合肽可以和细菌基因组结合并改变 DNA 的分子构象,使得在紫外区的特征吸收峰降低,产生减色效应。

2.3.3 荧光光谱法分析杂合肽与 MRSA 基因组 DNA 的结合: 荧光分光光度计测定不同浓度梯度的杂合肽溶液滴定基因组 DNA 溶液的荧光光谱。当激发波长 $\lambda_{ex}=360$ nm 时,溶液在 $\lambda_{em}=550-750$ nm 范围的荧光光谱如图 5 所示。通过对照组可以观察到基因组 DNA 的特异性荧光波长在 593 nm 处。随着溶液中杂合肽浓度的增加,溶液的荧光强度也显著增强,峰值所在的特异性波长变化不明显。杂合肽在实验浓度范围和测试波长范围内几乎检测不

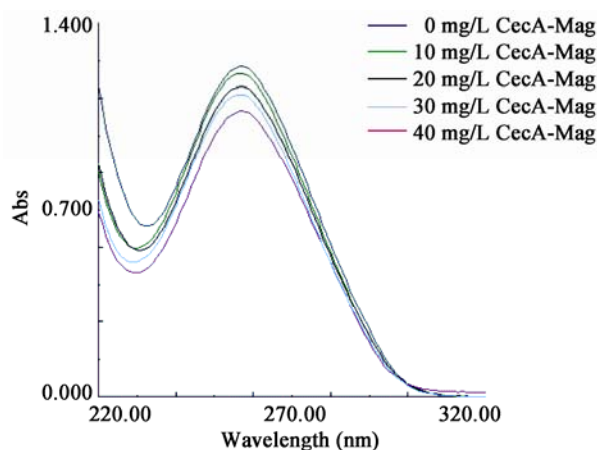


图4 不同浓度的杂合肽与 MRSA 基因组 DNA 的紫外光谱分析

Figure 4 UV spectra of different concentrations CecA-Mag interacted with MRSA genomic DNA

到杂合肽自身荧光的存在,可以忽略。而加大杂合肽浓度,当杂合肽的浓度超过 55 mg/L 时,杂合肽溶液本身会出现一定强度的荧光,这可能是杂合肽中存在的芳香族氨基酸浓度达到检测限的缘故,图中未列出。实验结果说明,杂合肽与 MRSA 基因组 DNA 发生结合,导致荧光光谱发生变化,这主要是因为杂合肽中的芳香族氨基酸残基形成的刚性平面基团嵌插到 DNA 螺旋链的碱基对和螺旋链中,形成堆积效应或处于 DNA 作用面的疏水环境,使 DNA 的荧光强度发生增强,该检测结果与紫外光谱分析结果一致。

2.3.4 杂合肽对 EB-DNA 复合体系滴定的荧光光谱分析: 不同浓度梯度的杂合肽溶液对 EB-DNA 复合体系溶液滴定,荧光分光光度计检测激发波长 $\lambda_{\text{ex}}=360$ nm,溶液在 $\lambda_{\text{em}}=550-750$ nm 波长范围内的荧光光谱。结果如图 6 所示,EB-DNA 体系的荧光特征峰在 602 nm 处,随着溶液中杂合肽浓度的增加,荧光强度逐渐减低,并且荧光的特异峰值发生了紫移,由 602 nm 移动到了 595 nm 处。实验结果说明,杂合肽与 EB 存在竞争性结合 DNA,因杂合肽结合 DNA 后的荧光强度没有 EB-DNA 复合体系强,因而随着杂合肽加入浓度的增大,导致 DNA 结合 EB 的量减少,荧光强度降低;杂合肽替代了 EB-DNA 体系中的部分 EB,引起光谱特异峰值发生紫移。

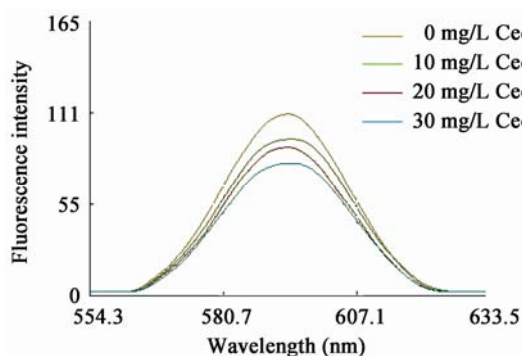


图 5 不同浓度的杂合肽与 MRSA 基因组 DNA 的荧光光谱

Figure 5 Fluorescence spectra of different concentrations CecA-Mag interacted with MRSA genomic DNA

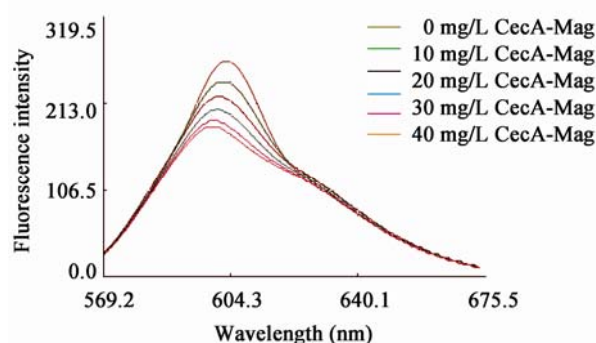


图 6 不同浓度的杂合肽溶液对 EB-DNA 复合体系的荧光光谱

Figure 6 Fluorescence spectra of different concentrations CecA-Mag interacted with EB-DNA

2.3.5 EB 对杂合肽-DNA 复合体系滴定的荧光光谱分析: 不同浓度梯度的 EB 溶液对杂合肽-DNA 复合体系溶液滴定,荧光分光光度计检测荧光光谱的变化。如图 7 所示,通过对照组观察到杂合肽-DNA 复合体系的特异荧光峰值在 593 nm 处。随着溶液中 EB 浓度的增大,杂合肽-DNA 复合体系的荧光强度逐渐升高,荧光特异峰值发生蓝移,由 593 nm 移动到了 599 nm 处,这表明随着溶液中 EB 量的增加,EB 取代了杂合肽-DNA 复合体系中的杂合肽。以上结果有力地证明了溶液体系中杂合肽与 EB 存在竞争性结合 DNA 的方式,即杂合肽与 DNA 的作用机制中存在类似于 EB 结合 DNA 的方式。

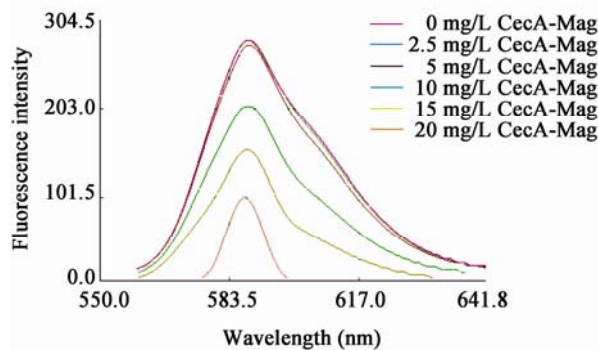


图 7 不同浓度的 EB 溶液对杂合肽-DNA 复合体系的荧光光谱

Figure 7 Fluorescence spectra of different concentrations EB interacted with CecA-Mag-DNA

2.3.6 天蚕素 A-马盖宁杂合肽与 MRSA 基因组 DNA 的结合方式: Lepecq 等研究发现, Scatchard 方程: $r_E/c_E = K_E(n - r_E)$ 可以用来描述 EB 与 DNA 的相互作用方式^[16]。式中 r_E 为 DNA 分子中每个核苷酸上结合 EB 的分子个数。 n 为 DNA 上每个核苷酸可提供的 EB 结合位点数, 是 r_E 的最大值, 线性 DNA 为 0.22。 K_E 为结合常数, 对不同来源的 DNA, 其取值范围在 $0.7 \times 10^7 - 7 \times 10^7$ 。

当体系中存在 EB 与杂合肽竞争性结合 DNA 时, 其结合特征可以用下式来描述:

$$r_E/c_E = (n - r_E)[K_E/(1 + K_M c_M)] \quad (1)$$

$$r_M/c_M = (n - r_M)[K_E/(1 + K_E c_E)] \quad (2)$$

式中: r_E , r_M 为 DNA 分子中每个核苷酸上结合 EB、杂合肽的分子个数, 即 EB、杂合肽的结合浓度与 DNA 总浓度 c_{DNA} 的比值; c_E , c_M 为 EB、抗菌肽的游离浓度; K_E , K_M 为 EB、抗菌肽分别与 DNA 结合的结合常数。 K_M 代表物质与 DNA 结合形成复合物的稳定性, K_M 值越大代表结合越稳定。对于直线双链 DNA, $n=0.22$, $K_E=5 \times 10^7 \text{ mol/L}$ ^[17]。

以 r_E/c_E 为纵坐标, r_E 为横坐标作图, 得到一条直线, 若所得直线的 n 值和 K 值与 DNA 溶液中仅有 EB 时 Scatchard 图的 n 值相同, 而 K 值改变, 则杂合肽与 DNA 的作用方式为竞争型嵌入方式; 若有相同的 K 值, n 值变小, 则杂合肽与 DNA 的作用为非嵌入方式; 若 K 值和 n 值都改变, 说明杂合肽与 DNA 的作用为嵌入和非嵌入两种方式, 表现为混合型^[18]。另外,

$$c_E = c_{tE} - r_E c_{DNA} \quad (3)$$

$$c_M = c_{tM} - r_M c_{DNA} \quad (4)$$

式中: c_{tE} 、 c_{tM} 为 EB、杂合肽的总浓度, 由(1)和(2)式可推导出。

$$r_M = n - r_E - 1/(K_E c_E) \quad (5)$$

$$K_M = [(n - r_E)K_E c_E / r_E - 1] / c_M \quad (6)$$

假设 F_0 、 F 分别为未加、已加杂合肽时 EB-DNA 复合体系的荧光强度值, F' 为有杂合肽共存时 EB-DNA 复合体系的荧光强度最低值(由实验测定), 则有:

$$c_E = [(F_0 - F)/(F_0 + F')] c_{tE} \quad (7)$$

根据荧光数据和 EB 的总浓度 c_{tE} , 可计算出 EB

的游离浓度 c_E , 然后由(3)式可以求出 r_E 。由(4)-(6)式可求得杂合肽与 DNA 的结合常数 K_M 。

通过计算得出天蚕素 A-马盖宁杂合肽与 MRSA 基因组 DNA 之间相互作用 Scatchard 方程的结合常数 $K_M=1.87 \times 10^7$, 成键位点数 $n=0.13$ 。由此可以得出: 在天蚕素 A-马盖宁杂合肽存在下, DNA 与 EB 作用的结合常数 K 和成键位点数 n 都发生了变化, 表现为混合型作用模式, 即杂合肽与 DNA 的作用为嵌入和非嵌入两种方式。

3 结论与讨论

MRSA 感染的高发率, 不断增加的耐药性, 感染过程越来越严重, 已经成为临床抗菌治疗的难题之一。自 20 世纪 70 年代瑞典科学家 Boman 等^[19]首次在天蚕血淋巴中发现抗菌肽以来, 抗菌肽一直成为生命科学研究热点之一, 并在各种生物中发现了大量的抗菌肽。特别是在目前抗生素的耐药性日益严峻的情况下, 抗菌肽的应用价值倍受重视。抗菌肽的抑菌机制研究, 到目前为止还未有一个涵盖所有抗菌肽作用机理的理论。其中, 近二十年来研究的重点主要着眼于抗菌肽对细菌细胞膜的作用^[20]。抗菌肽通过破坏细胞膜的完整性并产生或不产生穿孔现象, 造成细胞内容物溢出胞外而死亡, 又或者通过进入细菌胞内与胞内 DNA 分子结合, 影响细胞正常生理代谢功能, 最终导致细菌死亡, 再或者使细菌细胞壁形成孔洞, 胞内物质外泄导致细菌死亡^[21]。

天蚕素 A-马盖宁杂合肽因其具有广谱的抗菌活性, 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均具有良好的抑菌作用, 表现出良好的临床应用前景^[22]。通过我们前期的实验研究发现, 天蚕素 A-马盖宁能够与细菌细胞膜发生作用, 改变细胞膜的通透性^[5]。为进一步确定杂合肽能否进入 MRSA 胞内, 在胞内的结合位置以及结合方式, 在实验中我们对天蚕素 A-马盖宁的胞内作用机制进行了探索。研究利用激光扫描共聚焦显微镜观察到杂合肽可以进入 MRSA 胞内, 在胞内形成累积。杂合肽进入胞内后, 在胞内累积的过程中是否与胞内的生物大分子, 尤

其是 DNA 发生了结合呢? 我们通过提取细菌基因组 DNA, 进行体外实验。凝胶阻滞分析的结果证明杂合肽可以与基因组 DNA 结合, 并且具有较强的结合能力。为进一步研究杂合肽对基因组 DNA 的作用, 我们利用紫外光谱分析, 研究证明杂合肽与 DNA 结合后, 改变了 DNA 的分子构象, 导致紫外光谱产生减色效应。通过测定杂合肽与 DNA 作用的荧光光谱, 实验结果同样证明, 杂合肽与 DNA 发生结合, 并改变了 DNA 的分子构象, 这主要是因为杂合肽中的芳香族氨基酸残基形成的刚性平面基团嵌插到 DNA 螺旋链的碱基对和螺旋链中, 形成堆积效应或处于 DNA 作用面的疏水环境中。通过杂合肽对 EB-DNA 复合体系滴定的荧光光谱分析及 EB 对杂合肽-DNA 复合体系滴定的荧光光谱分析实验研究, 证明了杂合肽与 EB 能够竞争性结合 DNA, 杂合肽与 DNA 的作用为嵌入式和非嵌入式两种方式, 即混合型作用方式。

综上所述, 天蚕素 A-马盖宁杂合肽对 MRSA 作用的抑菌机制, 首先天蚕素 A-马盖宁进入细菌胞内, 能与胞内的 DNA 分子发生结合, 引起 DNA 分子构象的改变, 杂合肽与 DNA 结合后, 通过嵌插入 DNA 的碱基对中, 影响 DNA 分子的复制、转录功能, 最终导致细菌死亡。关于天蚕素 A-马盖宁杂合肽作用 MRSA 细胞后, 对其生理代谢中其他生物大分子的影响, 有待进一步研究。

参考文献

- [1] Hu FP, Zhu DM, Wang F, et al. CHINET 2013 surveillance of bacterial resistance in China[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2014, 14(5): 369-378 (in Chinese)
胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2013年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 14(5): 369-378
- [2] Taitt CR, North SH, Kulagina NV. Antimicrobial peptide arrays for detection of inactivated biothreat agents[A]//Cretich M, Chiari M. Peptide Microarrays: Methods in Molecular BiologyTM[M]. New York: Humana Press, 2009, 570: 233-255
- [3] Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. Peptide antimicrobial agents[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2006, 19(3): 491-511
- [4] Wang XQ, Zhu MX, Zhang AJ, et al. Synthesis and secretory expression of hybrid antimicrobial peptide CecA-mag and its mutants in *Pichia pastoris*[J]. Experimental Biology and Medicine, 2012, 237(3): 312-317
- [5] Yu LM, Yang TT, Wang XQ. CecropinA-Magainin, a new hybrid antibacterial peptide against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Sichuan University (Medical Science Edition), 2015, 46(2): 218-221 (in Chinese)
于龙魅, 杨田田, 王秀青. 新型天蚕素 A-马盖宁杂合肽对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌杀菌作用的机制研究[J]. 四川大学学报: 医学版, 2015, 46(2): 218-221
- [6] Doenecke D. Ethidium bromide (EB) binding to nucleosomal DNA, Effects on DNA cleavage patterns[J]. Experimental Cell Research, 1977, 109(2): 309-315
- [7] Sarukhanyan E, Milano G, Roccatano D. Cosolvent, ions, and temperature effects on the structural properties of cecropin A-Magainin 2 hybrid peptide in solutions[J]. Biopolymers, 2015, 103(1): 1-14
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: sixteenth informational supplement[S]. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2012: 1-150
- [9] Hong J, Hu JY, Qu EJ, et al. Mechanisms of tachyplesin I against *Escherichia coli*[J]. Microbiology China, 2013, 40(6): 1018-1026 (in Chinese)
洪军, 胡建业, 屈二军, 等. 蜚源抗菌肽对大肠杆菌的抑杀机理[J]. 微生物学通报, 2013, 40(6): 1018-1026
- [10] Jacob B, Kim Y, Hyun JK, et al. Bacterial killing mechanism of sheep myeloid antimicrobial peptide-18 (SMAP-18) and its Trp-substituted analog with improved cell selectivity and reduced mammalian cell toxicity[J]. Amino Acids, 2014, 46(1): 187-198
- [11] Diaz M, Watson NB, Turkington G, et al. Decreased frequency and highly aberrant spectrum of ultraviolet-induced mutations in the hprt gene of mouse fibroblasts expressing antisense RNA to DNA polymerase zeta[J]. Molecular Cancer Research, 2003, 1(11): 836-847
- [12] Li LR. Study on the design and antibacterial mechanism of antibacterial peptides based on DNA[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2013 (in Chinese)
李莉荣. 以 DNA 为靶标的抗菌肽设计及抑菌机制研究[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2013
- [13] Selim M, Chowdhury SR, Mukherjee KK. DNA binding and nuclease activity of a one-dimensional heterometallic nitrosyl complex[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2007, 41(5): 579-583
- [14] Tang YL. Purification of antimicrobial peptides from housefly larvae and their effects on bacterial membrane and DNA[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2009 (in Chinese)
唐亚丽. 家蝇抗菌肽的分离及对细菌壁膜和 DNA 的作用[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2009
- [15] Li LR, Shi YH, Cheserek MJ, et al. Antibacterial activity and dual mechanisms of peptide analog derived from cell-penetrating peptide against *Salmonella typhimurium* and *Streptococcus pyogenes*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(4): 1711-1723
- [16] Lepecq JB, Paoletti C. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids: Physical-chemical characterization[J]. Journal of Molecular Biology, 1967, 27(1): 87-106
- [17] Howe-Grant M, Wu KC, Bauer WR, et al. Binding of platinum and palladium metallointercalation reagents and antitumor drugs to closed and open DNAs[J]. Biochemistry, 1976, 15(19): 4339-4346
- [18] Hu M, Zhang ZX, Shen GL, et al. Studies on aclacinomycin spectral characters and the interaction between aclacinomycin and DNA by spectroscopic method[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2006, 26(9): 1668-1671 (in Chinese)
胡敏, 张镇西, 沈国励, 等. 阿克拉霉素 A 与 DNA 作用的光谱学研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(9): 1668-1671
- [19] Boman HG, Nilsson I, Rasmuson B. Inducible antibacterial defence system in *Drosophila*[J]. Nature, 1972, 237(5352): 232-235
- [20] Bechinger B, Salnikov ES. The membrane interactions of antimicrobial peptides revealed by solid-state NMR spectroscopy[J]. Chemistry and Physics of Lipids, 2012, 165(3): 282-301
- [21] Harder J, Bartels J, Christophers E, et al. Isolation and characterization of human β -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(8): 5707-5713
- [22] Téllez GA, Castaño-Osorio JC. Expression and purification of an active cecropin-like recombinant protein against multidrug resistance *Escherichia coli*[J]. Protein Expression and Purification, 2014, 100: 48-53