

螫源抗菌肽对大肠杆菌的抑杀机理

洪军* 胡建业 屈二军 孙婕 刘瑞芳 周政 管玉周

(河南城建学院 生命科学与工程学院 河南 平顶山 467036)

摘要: 【目的】研究螫源抗菌肽螫素对大肠杆菌抑杀的作用机理, 为防治大肠杆菌引起的肠道疾病提供新的潜在抗菌药物。【方法】利用牛津杯法和微量 MH 肉汤稀释法测定其抗菌活性, 激光共聚焦扫描显微镜观察螫素对大肠杆菌的结合、分布及杀伤过程, 透射电镜观察螫素对大肠杆菌超微结构的影响, 并采用琼脂糖凝胶阻滞电泳研究其对大肠杆菌基因组 DNA 和 RNA 的影响。【结果】螫素对大肠杆菌的最小抑菌浓度与最低杀菌浓度分别为 5 mg/L 和 20 mg/L; 激光共聚焦扫描显微镜和透射电镜观察发现螫素能快速作用于细胞表面, 并发生聚集现象, 随着作用时间的延长能导致细胞膜结构的破坏和细胞内含物的释放; 通过琼脂糖电泳结果显示螫素也能够作用于大肠杆菌基因组 DNA, 并呈浓度依赖关系, 10 mg/L 螫素对基因组 DNA 无明显影响, 80 mg/L 螫素能导致 DNA 断裂; 凝胶阻滞电泳显示螫素也能与基因组 DNA 和 RNA 发生结合。【结论】研究结果为深入探讨螫素抑杀大肠杆菌的分子机制提供重要的理论依据。

关键词: 螫素, 大肠杆菌, 作用机理, 电泳, 显微镜

Mechanisms of tachyplesin I against *Escherichia coli*

HONG Jun* HU Jian-Ye QU Er-Jun SUN Jie LIU Rui-Fang

ZHOU Zheng GUAN Yu-Zhou

(College of Life Science and Engineering, Henan University of Urban Construction,
Pingdingshan, Henan 467036, China)

Abstract: [Objective] The role mechanism of tachyplesin I on *Escherichia coli* was investi-

基金项目: 河南城建学院博士启动基金项目(No. 2012JBS002)

*通讯作者: Tel: 86-375-2089072; ✉: hongjun@hncj.edu.cn

收稿日期: 2012-08-17; 接受日期: 2012-11-26

gated to provide potential novel antibacterial drugs for treating disease caused by enteropathogenic bacteria. **[Methods]** Antimicrobial activity for tachyplesin I for *Escherichia coli* was determined using Oxford cup and micro-broth dilution methods. The combination, distribution and killing process of tachyplesin I against *Escherichia coli* were observed under laser confocal scanning microscopy. Ultrastructure of tachyplesin I against *Escherichia coli* was observed under transmission electron microscope. The genomic DNA and RNA binding ability of tachyplesin I was examined by agarose gel retardation electrophoresis in this experiment. **[Results]** The minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration was 5, 20 mg/L, respectively. The results of laser confocal scanning microscopy and transmission electron microscope indicated that tachyplesin I penetrated the cell membrane of *Escherichia coli* and accumulated in the cytoplasm immediately after being added to the cells. Later, membrane damage and cellular content outflow was seen. And tachyplesin I had effect on genomic DNA in a concentration-dependent manner. The low concentrations of tachyplesin I (10 mg/L) had no obvious effect on DNA, while the high concentrations of tachyplesin I (above or equal to 80 mg/L) could lead to break in genomic DNA. Tachyplesin I could combine with genomic DNA and RNA. **[Conclusion]** The results provide a theoretical basis to further understand sterilization mechanism of tachyplesin I at molecular level.

Keywords: Tachyplesin I, *Escherichia coli*, Mechanism, Electrophoresis, Microscope

自从 1972 年瑞典科学家 Boman 等首先在果蝇中发现抗菌肽以来, 动物源性的抗菌肽因其抗菌谱广, 不易产生抗药性而备受关注, 其作用机理一直成为研究的热点。在抗菌肽的杀菌机制研究中, 对细胞膜的作用机制研究最多, 也最为透彻, 并提出了抗菌肽对细菌靶细胞膜攻击作用的几种模型^[1-2], 但不同抗菌肽对细菌靶细胞膜攻击的作用机制不同。Park 等^[3]通过激光共聚焦扫描显微镜观察 Magainin 2 对大肠杆菌的杀菌作用, 结果表明 Magainin 2 抗菌肽仅能作用在细菌壁上, 不能穿透细胞膜。而抗菌肽 Pexiganan 是蛙皮素 Magainin 的一种类似物, 它是通过破坏细菌细胞膜的完整性来达到杀菌的目的^[4]。但抗菌肽还可以通过与细菌胞内二级靶点的作用发挥其抗菌作用。研究报道表明许多抗菌肽的二级杀菌靶点是通过抑制细菌胞内酶活性、蛋白质、DNA

或 RNA 合成来抑杀细菌。抗菌肽 Buforin II 通过大肠杆菌的 DNA 和 RNA 结合, 来抑制细菌的复制与转录, 导致菌体死亡^[3]。此外, 一些研究者还发现某些抗菌肽能穿过细胞膜到达细胞内部与 DNA 结合而不破坏细胞膜^[5-6]。

本研究中鲎素 (Tachyplesin I) 是日本学者 Nakanura 等从东方鲎血细胞中分离出来的一种由 17 个氨基酸残基构成的阳离子抗菌肽, 具有典型环状 β -折叠结构^[7], 相对分子质量(Mr)约为 2.3 kD, 等电点 pI 为 12.3, 内含 2 个二硫键, 具有广谱抗菌活性, 可抑杀细菌、真菌、病毒和原虫, 还具有抑制肿瘤细胞增殖和诱导癌细胞分化的作用。Hirakura 等^[8]研究表明, 鲎素与细菌细胞膜上的类脂形成肽脂超分子复合体, 使脂和肽相互耦合, 实现鲎素的跨膜转运作用, 鲎素并未导致细菌的细胞膜破裂; 鲎素也是一个形成环形孔的

抗菌肽,作用类似于 Magainin2、MSI-78 和 LL-37 抗菌肽^[9]。然而,到目前为止鲎源抗菌肽对大肠杆菌的动态杀菌过程以及对细菌基因组 DNA 和 RNA 的作用是相对未知。因此,本文采用激光共聚焦扫描显微镜观察鲎素对大肠杆菌的结合、分布及杀伤过程,通过透射电镜观察了鲎素对大肠杆菌细胞的超微结构变化,并采用琼脂糖凝胶阻滞电泳研究其对大肠杆菌基因组 DNA 和 RNA 的影响,为深入揭示鲎素的作用机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 抗菌肽

鲎素:由吉尔生化(上海)有限公司合成,纯度为 95%以上。合成序列: $\text{NH}_2\text{-K-W-C-F-R-V-C-Y-R-G-I-C-Y-R-R-C-R-CONH}_2$, 含两对二硫键存在于 C3 和 C16, C7 和 C12 之间。

1.2 试验菌株

大肠杆菌 ATCC8739,由广东省微生物菌种保藏中心(GIMCC)提供。

1.3 主要试剂及仪器

所用试剂均为分析纯; FITC (异硫氰酸荧光素)标记的鲎素,由深圳翰宇公司合成; L-多聚赖氨酸,由广州鼎国生物技术有限公司提供; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒和 RNase A 均由宝生物工程(大连)有限公司提供; RNA 提取纯化试剂盒由天根生化科技公司提供; 琼脂糖由北京赛百奥科技有限公司提供。

激光扫描共聚焦显微镜(Leica TCS-SP5); 透射电子显微镜(Tecna G2 12); 岛津 UV-2450 型紫外分光光度计; 德国 Eppendorf 核酸蛋白测定仪; DYY-III 型电泳仪、电泳槽(北京六一仪器厂)。

1.4 鲎素的抗菌活性测定

采用牛津杯法测定抗菌肽的抑菌效果,取对数生长期的菌液加入到 6 mL LB 琼脂糖固体培养

基中混匀倒入 60 mm 小平皿中,使平皿中菌液最终浓度为 5×10^7 个/mL,然后用无菌镊子将灭菌的牛津杯轻轻平置于菌液平板培养基表面。再将不同浓度的抗菌肽 200 μL 加入牛津小杯中,阴性对照为灭菌水。培养平皿先在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中放置 3 h,使鲎素充分扩散到培养基中,然后再将平皿置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养,24 h 后取出观察。用游标卡尺测量抑菌圈半径,重复 3 次,计算平均值,用抑菌圈直径表示抑菌活性。

采用微量 MH 肉汤稀释法测定抗菌肽的最小抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)^[10]。

1.5 鲎素的杀菌率测定

将过夜培养的菌液以 1:25 (V/V)接种于 50 mL 的营养肉汤培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2–3 h 后,取菌液离心收集菌体,并用 10 mmol/L PBS (pH 7.4)缓冲液洗 2 次后,再将菌液悬浮在此缓冲液中,菌液浓度约为 1×10^9 个/mL。分别取 2 mL 大肠杆菌菌液与不同浓度的鲎素(0, 1.25, 2.50, 5.00, 7.50, 10.00 mg/L)作用 60 min。将反应后的菌液稀释 10^5 倍,将 100 μL 稀释的菌液涂于营养琼脂平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。第 2 天,计算存活的菌落数。细菌成活率(Survival, %)=(鲎素处理后的存活细胞数/未加鲎素的存活细胞数) $\times 100$ 。

1.6 激光共聚焦扫描显微镜观察(LSCM)

大肠杆菌 ATCC8739 于培养皿中涂布培养过夜,挑取细菌单克隆于 2 mL 营养肉汤中,振荡培养,收集对数期的细菌培养液于 5 000 r/min 离心 5 min,去掉上清,用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4)洗 2 次,重悬于相同的磷酸缓冲液中,菌液浓度约为 1×10^8 个/mL。取少许菌液涂于用多聚赖氨酸处理的 Petri 皿上,加适量 FITC 标记的鲎素后用激光扫描共聚焦显微镜(Leica TCS-SP5)观察鲎素与细胞的结合、分布及杀伤细胞的过程。激光波长为 488 nm,观察其 495 nm 发射光。

1.7 鲎素对大肠杆菌作用的透射电镜观察

将待测细菌放入营养肉汤中 37 °C 培养, 在对数生长期取菌液经 5 000 r/min 离心 10 min, 弃上清收集沉淀, 用 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.2, PBS)冲洗 2 次, 然后用 PBS 调节菌的浓度为 1.5×10^8 个/mL, 吸取制备好的菌液 2 mL 至离心管中, 然后加入鲎素至终浓度为 10 mg/L, 混匀, 于 37 °C 保温孵育 30 min 和 60 min 后, 离心收集菌体, 然后用 PBS 缓冲液洗涤菌体 3 次。以灭菌水处理的菌液为对照。吸取制备好的菌液于离心管中, 加入 4%戊二醛固定液在 4 °C 冰箱中固定过夜(不可以打散菌体), 然后按常规方法处理样品, 透射电镜观察记录、拍照^[11]。

1.8 鲎素对大肠杆菌基因组 DNA 的影响

1.8.1 细菌基因组 DNA 的提取: 参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒进行, 测定大肠杆菌 ATCC8739 的基因组 $OD_{260}/OD_{280} \geq 1.90$, 纯度符合试验要求。

1.8.2 鲎素对大肠杆菌作用前后基因组 DNA 的影响: 取对数生长期的大肠杆菌培养物 $3\ 000 \times g$ 离心 10 min 收集沉淀, 用 PBS 调整菌液密度为 1.5×10^8 个/mL, 分别取 3 mL 菌液放入试管中, (1) 加入 10 mg/L 浓度的鲎素, 空白对照组用 PBS 替代, 37 °C 分别保温孵育 10、60、90、120 min; (2) 然后加入不同浓度的鲎素, 空白对照组用 PBS 替代, 37 °C 保温孵育 30 min 后; 上述两种方案处理后, 进行大肠杆菌基因组 DNA 提取。取上述提取的基因组 DNA 样品 5 μ L 与 1 μ L 6 \times Loading buffer 上样缓冲液混匀后, 加入到样品孔中, 进行 1%琼脂糖(每 50 mL 中加入 6 μ L EB)凝胶电泳, 电压为 90 V, 电流为 80 mA, 电泳时间约 65 min, 电泳完毕将胶放入紫外透射仪观察现象, UVP 凝胶成像系统记录结果。

1.8.3 凝胶阻滞电泳检测鲎素与细菌基因组 DNA 的结合: 基因组 DNA 和鲎素均溶于

0.01 mol/L Tris-HCl (pH 7.2)缓冲液中, 保持恒定浓度的大肠杆菌 DNA (25 mg/L), 与不同终浓度的鲎素(0、2.5、5、10、20、40、80、160 mg/L)室温避光孵育 30 min 后, 进行 1%琼脂糖(EB)凝胶电泳, 电压 90 V, 电流 75–80 mA, 电泳时间约 60 min。加样量为 10 μ L。

1.9 鲎素对大肠杆菌 RNA 的影响

RNA 的提取按细菌总 RNA 提取纯化试剂盒的方法进行, 提取之后取 1 μ L RNA 样品, 与 1 μ L 10 \times Loading buffer 混合, 进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳, 检测所提 RNA 的质量; 同时用紫外分光光度计检测其浓度, 使其 OD_{260} 和 OD_{280} 比值接近 2.0, 质量符合要求后, 取 10 μ L RNA 样品与 10 μ L 鲎素溶液(溶于 pH 7.2, 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液)在冰浴上作用 50 min 后, 进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳。

2 结果与分析

2.1 鲎素对大肠杆菌的抗菌活性

用牛津杯法测定抗菌肽的抑菌效果, 结果如图 1 所示, 经检测 10 mg/L 鲎素的抑菌圈直径约 $7.30\text{ mm} \pm 0.11\text{ mm}$, 5 mg/L 鲎素的抑菌圈不明显。

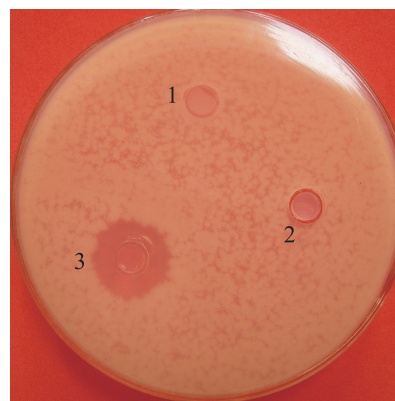


图 1 鲎素对大肠杆菌的抑菌作用

Fig. 1 Antimicrobial effect of tachyplesin to *E. coli*

注: 1: 无菌水; 2: 5 mg/L 处理; 3: 10 mg/L 处理。

Note: 1: Sterile water; 2: Treatment (5 mg/L); 3: Treatment (10 mg/L).

通过微量 MH 肉汤稀释法测定鲎素对大肠杆菌的 MIC 为 5 mg/L, MBC 为 20 mg/L, 此结果表明鲎素对大肠杆菌有抗菌活性。

2.2 鲎素对大肠杆菌的杀菌率测定

从图 2 可知, 鲎素能快速杀死大肠杆菌, 在 60 min 内, 10 mg/L 鲎素处理大肠杆菌后成活率为 $20.03\% \pm 1.62\%$; 根据此杀菌率的测定进行后续的实验。

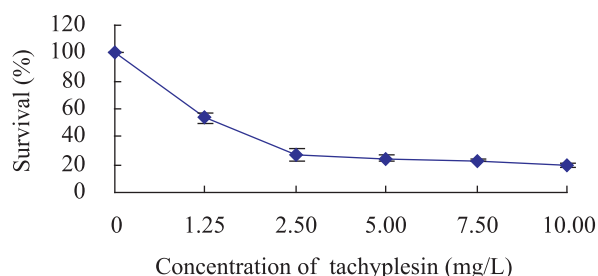


图 2 不同浓度鲎素作用大肠杆菌 60 min 的存活率

Fig. 2 The survival rate of *E. coli* in different concentrations of tachyplesin in 60 min

2.3 LSCM 观察

为了观察鲎素与细胞的结合、分布及杀伤细胞的过程, 采用 FITC 荧光标记偶联鲎素, 在 488 nm 激光的激发下, 该偶联物发射出绿色荧光, 通过 LSCM 进行观察鲎素对大肠杆菌的抑杀

过程。本试验中, 标记的荧光素染料 FITC, 其分子本身不具有抗菌活性, 也对细菌细胞无穿透作用。从图 3 可知, 当 10 mg/L FITC 标记-鲎素与大肠杆菌接触的瞬间, 菌体立即被鲎素包围(图 3A), 聚集在细胞质膜表面, 随着作用时间的延长, 鲎素开始在细菌杆状的一端聚积, 细菌杆状一端开始破损, 变形(图 3B), 当作用时间为 10 min 时, 鲎素能使细胞膜上穿孔(图 3C)。总之, 鲎素对大肠杆菌的杀菌作用, 首要靶点是细胞质膜, 在短时间内主要通过使细胞膜穿孔, 内容物流出而导致细菌死亡。

2.4 鲎素作用细菌的透射电镜结果分析

通过透射电镜观察显示对照组大肠杆菌细胞表面结构完整, 细胞外观平滑, 细胞壁膜完整, 细胞内容物充实、致密(图 4A 所示)。而 10 mg/L 鲎素处理大肠杆菌 30 min 和 60 min 后的超微结构变化(图 4B、4C), 鲎素处理大肠杆菌 30 min 后, 细胞表面变得粗糙, 细胞壁膜伸出少许绒毛, 细胞质内形成大量空泡, 内容物凝集, 部分细胞壁膜、细胞器和细胞核区消失; 而作用 60 min 后, 发现部分细胞膜裂解、模糊甚至完全消失, 部分菌体变形。此透射电镜实验也证实了鲎素能导致细胞膜结构的破坏和细胞内含物的释放。

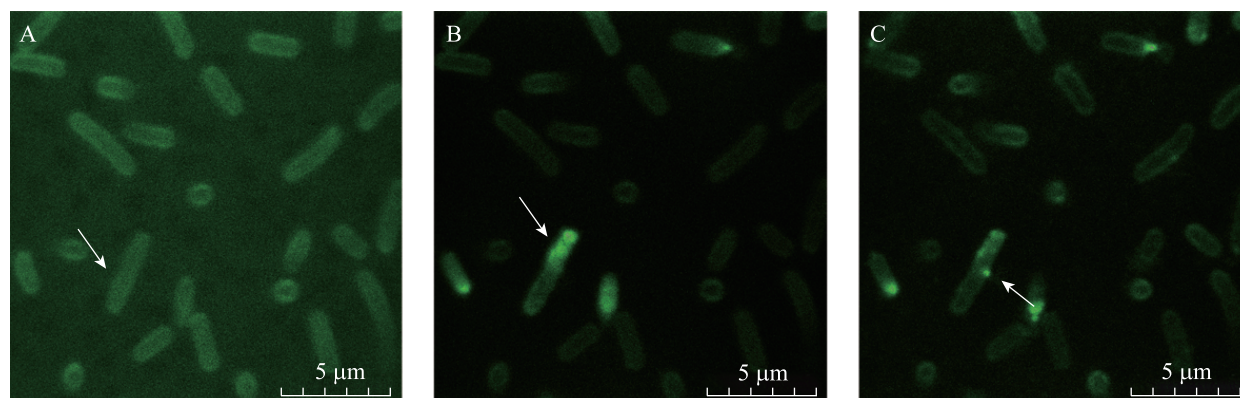


图 3 10 mg/L FITC 标记-鲎素作用大肠杆菌 10 min LSCM 图(8 000×)

Fig. 3 LSCM images of *E. coli* reacted with 10 mg/L FITC-labeled tachyplesin I in 10 min (8 000×)

Note: A: 0 min, B: 4.5 min, C: 10 min.

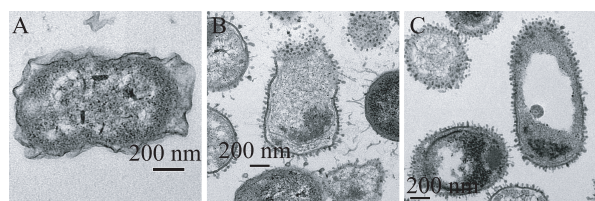


图4 鲎素处理后的大肠杆菌的透射电镜照片

Fig. 4 TEM photograph of *E. coli* treated with tachyplesin I

注: A: 正常对照; B: 处理 30 min; C: 处理 60 min.

Note: A: Control; B: 30 min treated; C: 60 min treated.

2.5 鲎素对大肠杆菌基因组 DNA 的影响

2.5.1 1%琼脂糖凝胶电泳检测鲎素对大肠杆菌

作用后基因组 DNA 的影响: 为了研究鲎素作用大肠杆菌后对基因组 DNA 的影响, 首先, 研究了同一浓度鲎素处理大肠杆菌不同时间后对基因组 DNA 的影响, 结果显示(图 5A): 与对照组相比, 10 mg/L 鲎素无论处理多长时间, 电泳后的 DNA 并无弥散状, 这说明 10 mg/L 鲎素在抑杀细菌过程中并没有引起基因组 DNA 的断裂。其次, 研究了不同浓度鲎素对大肠杆菌作用 30 min 后对基因组 DNA 的影响, 结果显示(图 5B): 电泳后

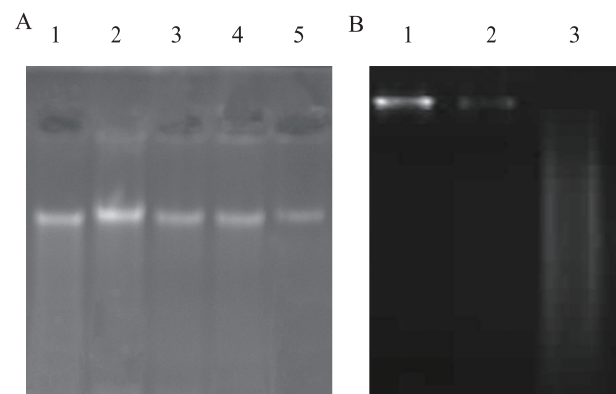


图5 鲎素与大肠杆菌作用后基因组的 DNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis of DNA from *E. coli* treated with tachyplesin I

注: A: 1-4: 10 mg/L 鲎素分别处理 120、90、60、10 min; 5: 对照基因组 DNA。B: 1: 对照基因组 DNA; 2-3: 10、80 mg/L 鲎素分别处理 30 min 基因组 DNA。

Note: A: 1-4: DNA treated with 10 mg/L tachyplesin I for 120, 90, 60, 10 min; 5: Control DNA. B: 1: Control genomic DNA; 2-3: DNA treated with 10, 80 mg/L tachyplesin I.

对照组基因组 DNA 呈现单一的条带, 胞内的基因组 DNA 完整; 而经过 10 mg/L 肽作用大肠杆菌后, 电泳后的 DNA 无明显弥散状, 但在 80 mg/L 肽浓度时, DNA 呈现不同程度的弥散状, 此结果表明鲎素对大肠杆菌抑杀过程中, 对基因组 DNA 的影响与肽的浓度有关, 高浓度时能引起基因组 DNA 的断裂, 使 DNA 受到损伤, 低浓度肽对 DNA 无影响。

2.5.2 1%琼脂糖凝胶阻滞电泳检测鲎素与细菌

基因组 DNA 的结合: 为了进一步观察鲎素与体外基因组 DNA 的相互作用, 凝胶阻滞实验发现在 2.5-40 mg/L 鲎素对体外大肠杆菌基因组 DNA 作用 30 min 后, 对基因组 DNA 无明显阻滞现象, 这可能是鲎素的浓度太低, 达不到对基因组 DNA 的影响, 但当鲎素大于等于 80 mg/L 时, 7-8 泳道无基因组 DNA 条带, 表明鲎素与 DNA 发生强烈结合使 EB 已经无法插入到 DNA 的碱基对中, 使得点样孔中的 DNA 没有发出荧光(图 6)。这也暗示鲎素与 DNA 的作用方式可能包括与 EB 类似物的核酸嵌入作用, 与 DNA 结合时, 与 EB 竞争性的插入到 DNA 碱基对中, 这也能从后续

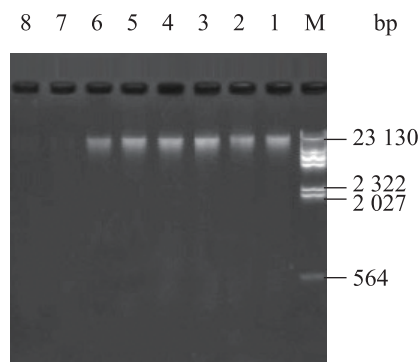


图6 鲎素与基因组 DNA 作用的 1%琼脂糖凝胶阻滞电泳图

Fig. 6 1% agarose gel electrophoresis of free genomic DNA and DNA with increasing amounts of tachyplesin I

注: 1: 无菌水; 2-8: 2.5、5、10、20、40、80、160 mg/L 鲎素; M: λ DNA/*Hind* III.

Note: 1: Sterile water; 2-8: 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160 mg/L tachyplesin I; M: λ DNA/*Hind* III.

的实验螯素对 DNA 结合的荧光光谱中得到证实。这也与高浓度螯素能引起体内基因组 DNA 损伤相一致。

2.6 螯素对大肠杆菌 RNA 的影响

为了了解螯素对大肠杆菌抑杀的分子机制,本试验进一步检测了螯素对 RNA 的结合能力。由图 7 的凝胶阻滞试验可以看出,与对照组的 RNA 相比,在 1.25–5.00 mg/L 螯素浓度时, RNA 的条带亮度无明显变化,表明螯素对大肠杆菌 RNA 无明显影响,但当螯素浓度大于 5 mg/L 时, RNA 的条带亮度变淡,推测螯素可能与大肠杆菌 RNA 发生了结合和降解作用,螯素浓度越高对 RNA 的影响越大。因为 RNA 的亮度随着螯素浓度升高而变淡推测可能由于螯素与核酸染料竞争 RNA 的结合位点导致的,螯素如何影响 RNA 有待进一步研究。

此结果也与螯素对基因组 DNA 的影响一致,说明螯素能与细胞内的 DNA 和 RNA 发生结合作用。

3 讨论

目前关于抗菌肽的作用机理还未达成共识,

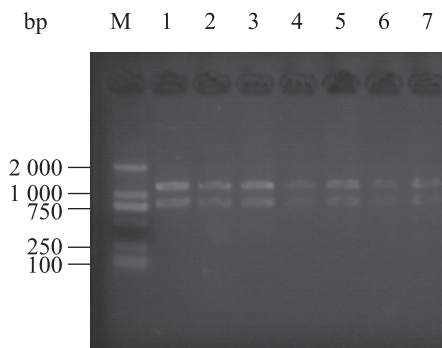


图 7 不同浓度的螯素对大肠杆菌 RNA 的影响

Fig. 7 Agarose gel electrophoresis of *E. coli* RNA interaction with increasing amounts of tachyplesin I for 50 min

注: M: Marker; 1–3: 0、1.25、2.5 mg/L; 4: 10 mg/L; 5: 5 mg/L; 6–7: 20、40 mg/L 螯素.

Note: M: Marker; 1–3: 0, 1.25, 2.5 mg/L; 4: 10 mg/L; 5: 5 mg/L; 6–7: 20, 40 mg/L tachyplesin I.

但大多数研究成果认为抗菌肽的杀菌机理主要是通过作用于细菌的细胞膜,破坏其完整性并产生穿孔现象,造成细胞内容物溢出胞外而死亡^[12],或者是抗菌物质进入胞内与基因组 DNA 发生结合,引起细胞结构功能的破坏而导致细菌死亡^[13]、或者是使细胞壁形成孔洞,胞内内容物流出导致细菌死亡^[14]。本研究首次通过激光共聚焦扫描显微镜观察螯素对大肠杆菌的动态作用过程,结果发现 10 mg/L 螯素攻击细菌的首要靶点是细胞质膜,螯素能迅速包围整个细胞质膜,随后累积在大肠杆菌的一端,使其变形破损,随着作用时间的延长使细胞膜破损,胞内内容物流出。随后,本研究通过透射电镜进一步证实螯素不仅作用于细胞壁膜,还能导致细胞膜结构的破坏,并能作用于胞内物质。这与 Hirakura 等报道的螯素未能使细胞膜破裂不一致,因本研究结果经扫描和透射电镜显示均能破坏其细胞膜结构,推测对细胞膜作用异同的原因可能与菌种、药物浓度、作用时间长短等有关。通过此扫描和透射电镜显示螯素不仅作用于细胞壁膜,还能破坏细胞膜结构,并能通过细胞膜作用于胞内物质,但细胞膜是其首要和重要杀菌靶点。

有些抗菌肽,细胞膜并不是唯一的作用靶点,还存在胞内二级作用靶点。有报道表明抗菌肽无论是与细菌的 DNA 结合,还是断裂降解 DNA,都会对 DNA 的正常合成、复制、转录及表达造成一定的影响^[15–16],还能通过抑制 RNA 和蛋白质的合成来达到杀死细菌的目的^[17]。在前期的研究中,Yonezawa 等 1992 年报道质粒 DNA 为螯素的胞内二级作用靶点,以及螯素能与质粒 DNA 结合,低剂量时可使 DNA 迁移速度变慢,高浓度螯素可使 DNA 发生断裂,显著降低质粒 DNA 的复制和转录^[18–19]。为了进一步揭示螯素对大肠杆菌基因组 DNA 和 RNA 的影响,本研究通过琼脂糖凝胶电泳发现,高浓度螯素时能导致基因组

DNA 断裂; 凝胶阻滞电泳发现鲎素也能与大肠杆菌基因组 DNA 和 RNA 发生结合。鲎素能与基因组 DNA 发生结合, 也验证了前期 Xie 等^[19]报道的通过紫外光谱仪发现鲎素能与基因组 F41 发生增色效应相一致。本研究结果揭示鲎素抑杀大肠杆菌的胞内杀菌机制与细菌 DNA 和 RNA 有关, 但鲎素如何与 DNA、RNA 和蛋白质的作用还有待于进一步研究。

综上所述, 关于鲎素对于大肠杆菌的抑杀机制来说, 鲎素主要通过作用于细胞质膜, 随着作用时间的延长能使细胞膜破裂, 胞内物质外泻, 在达到一定浓度时鲎素能与胞内 DNA 和 RNA 发生结合, 引起细胞结构功能的破坏而导致细菌死亡。本研究的结果是对鲎素的作用机理的重要补充, 对深入了解鲎素的作用机理极为重要, 同时为从分子水平上研究鲎素的作用机理, 深入阐明鲎素结构和功能的关系提供了有价值的信息。关于鲎素对大肠杆菌的基因组 DNA 的结合方式、以及对基因组 mRNA 表达、蛋白质合成的影响有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Epand RM, Epand RF. Modulation of membrane curvature by peptides[J]. *Biopolymers* Peptide Science, 2000, 55(5): 358–363.
- [2] Epand RM, Vogel HJ. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, 1462(1/2): 11–28.
- [3] Park CB, Kim HS, Kim SC. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, 244(1): 253–257.
- [4] Gottler LM, Ramamoorthy A. Structure, membrane orientation, mechanism, and function of pexiganan-a highly potent antimicrobial peptide designed from magainin[J]. *Biochimica Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2009, 1788(8): 1680–1686.
- [5] Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?[J]. *Nature Reviews. Microbiology*, 2005, 3(3): 238–250.
- [6] Patrzykat A, Friedrich CL, Zhang L, et al. Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, 46(3): 605–614.
- [7] Nakamura T, Furunaka H, Miyata T, et al. Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*) isolation and chemical structure[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1988, 263(32): 16709–16713.
- [8] Hirakura Y, Kobayashi S, Matsuzaki K. Specific interactions of the antimicrobial peptide cyclic β -sheet tachyplesin I with lipopolysaccharides[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2002, 1562(1/2): 32–36.
- [9] Imura Y, Nishida M, Ogawa Y, et al. Action mechanism of tachyplesin I and effects of PEGylation[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2007, 1768(5): 1160–1169.
- [10] Giacometti A, Cirioni O, Barchiesi F, et al. *In vitro* susceptibility tests for cationic peptides: comparison of broth microdilution methods for bacteria that grow aerobically[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, 44(6): 1694–1696.
- [11] 代建国, 谢海伟, 金刚, 等. 鲎素的抗菌靶点初探[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2008, 35(5): 563–569.
- [12] 崔艳红, 黄现青. 抗菌肽的抗菌机理及其应用[J]. *中国兽医杂志*, 2006, 42(9): 51–52.
- [13] 苑园园, 刘清明, 钟杨生, 等. CP7 抗菌蛋白对嗜水气单胞菌的抑杀作用机理[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(7): 949–957.
- [14] 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.
- [15] Chatterji M, Unniraman S, Mahadevan S, et al. Effect of different classes of inhibitors on DNA gyrase from *Mycobacterium smegmatis*[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2001, 48(4): 479–485.
- [16] Gong X, Shi YH, Le GW. Study on the interaction mechanism of antibacterial peptide MDL-1 in *Musca domestica* L and *E. coli* DNA by fluorescence spectra[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2005, 25(3): 420–423.
- [17] Yenugu S, Hamil KG, French FS, et al. Antimicrobial actions of the human epididymis 2 (HE2) protein isoforms, HE2alpha, HE2beta1 and HE2beta2[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2004, 2(61): 1–17.
- [18] Yonezawa A, Kuwahara J, Fujii N, et al. Binding of tachyplesin I to DNA revealed by footprinting analysis: significant contribution of secondary structure to DNA binding and implication for biological action[J]. Biochemistry, 1992, 31(11): 2998–3004.
- [19] Xie HW, Dai JG, Guo Y, et al. Investigation on multieffect and synergistic antibacterial mechanism of tachyplesin against Bacteria[J]. Chemistry and Bioengineering, 2008, 25(5): 50–53.

科技信息摘录

PNAS: 如何遏制亚洲禽流感

来自英国伦敦大学, 皇家兽医学院等处的研究人员仔细分析了越南北部的一个活禽市场, 由此构建了结构模型, 并指出这种活禽市场构成了一个高度互联的网络, 支持大规模的疾病传播。但是一些简单的消毒措施也许能破坏这个网络。相关成果公布在 PNAS 杂志上。

高致病性禽流感病毒引起动物及人类严重的、有时是致死性的疾病, 其以机体免疫系统介导的“细胞因子风暴”和病毒增殖引起的多器官衰竭为特征。1997 年, 在我国香港地区, 高致病性禽流感病毒 H5N1 型导致了 18 人感染, 6 人死亡, 首次证实高致病性禽流感可以危及人的生命。自 2003 年, 高致病性禽流感病毒再次在亚洲国家爆发, 构成重要威胁, 导致禽类流感病毒的流行, 并造成极大的经济损失和公共健康危害。

科学家们认为活禽市场为 H5N1 提供了一个主要的传播途径, 为了能进一步了解遏制这种致命性流感的方法, 在这篇文章中, 研究人员针对越南北部的活禽交易展开了研究, 他们发现这种活禽市场构成了一个高度互联的网络, 支持大规模的疾病传播。如果能对这些区域进行一些简单的消毒措施, 就能破坏这个网络, 防止这种疾病的传播。

研究人员仔细分析了越南北部的这个活禽市场的结构(Live bird market, LBM), 评估其社会网络, 构建研究模型, 从中他们发现大多数 LBM 都与另外一个 LBM 联系在一起, 既可以在网络内发生大规模的疾病传播, 也可以跨越网络边界而进入未感染区域的大规模疾病传播。

不过研究人员认为依然可以防控这种情况下的疾病传播, 比如说对这些市场环境每天严格执行消毒, 在少数选定的地点对市场环境、交易商的车辆和设备进行消毒, 就有可能防止疾病的传播。这并不需要事先了解感染的情况, 只要进行实验室监控就行。这些发现将有助于资源匮乏地区加强活禽市场管理的指导。

关于 H5N1, 近期国内的学者发现 H5N1 病毒有可能通过与人流感病毒的基因重配, 获得在哺乳动物之间高效空气传播的能力, 从而引起人间大流行。

研究人员在严格生物安全条件下, 采用反向遗传技术, 在保留 H5N1 病毒 HA 基因的前提下, 构建了含有 1–7 个不等的 2009 年甲型 H1N1 病毒基因的所有 127 种可能的重配病毒。利用小鼠测试了这 127 种重配病毒对哺乳动物的致病力, 发现其中三分之二以上对小鼠高度致死。利用豚鼠模型对 21 种重配病毒进行传播能力的评估, 结果发现, 有 8 种病毒能够经空气传播, 其中 4 种获得高效空气传播能力。

这不仅揭示了 H5N1 病毒对全球公共卫生构成的现实威胁, 也引发了社会恐慌, 一些科学家认为这创造了能在人类之间传播的危险病毒。

——摘自《中国生物技术信息网》 2013/5/21
<http://www.biotech.org.cn/information/107387>