

水产动物抗菌肽的研究进展

肖建光, 刘文生

(华南农业大学动物科学学院水产系, 广东广州 510642)

摘要: 抗菌肽是一种具有抗菌活性的生物短肽, 广泛存在于生物界中。综述了抗菌肽的几种类型及作用机理, 介绍了水产动物抗菌肽的研究状况及其在水产养殖上的应用前景。

关键词: 抗菌肽; 水产养殖; 作用机理

中图分类号: S917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-1278(2005)01-0004-02

抗菌肽(Antimicrobial peptides)最初是从昆虫免疫后的血淋巴细胞中发现的一类碱性多肽类物质。1975年瑞典科学家 G. Boman 等人^[1]用阴沟杆菌及大肠杆菌诱导惜古比天蚕蛹产生了抗菌活性多肽物质即天蚕素(Cecropins), 这是世界上第一个被发现的抗菌肽。随后人们从细菌、真菌、两栖类、高等植物、哺乳动物乃至人类中相继发现并分离获得了具有类似性质的活性多肽。最初由于人们发现这类活性多肽对细菌具有广谱高效杀菌活性, 因而命名为一抗菌肽, 但随着研究的深入, 发现某些抗菌肽对部分真菌、原虫和病毒也具有明显杀伤作用, 而且还可以促进伤口愈合, 对癌细胞和癌实体瘤有攻击作用而不破坏正常细胞^[2], 故许多学者又将其称之为多肽抗生素。但抗菌肽和常规的抗生素不同, 抗生素是通过一系列酶合成的产物, 而抗菌肽则是某个特定基因编码的产物。在杀菌机制上, 抗生素一般是通过抑制细菌细胞壁、蛋白质或 DNA 等的合成达到杀菌目的, 所以抗生素的抗菌一般是用于特殊的受体, 且细菌容易通过变异对抗生素产生抗性; 而抗菌肽抗菌时一般没有特殊的受体, 它一般是通过物理作用造成细胞膜的穿孔而达到广谱抗菌的效果, 所以抗菌肽的使用不容易使细菌产生抗性和交叉抗性^[3]。部分抗菌肽除了具有抗菌的作用外还具有抗真菌、抗病毒和抗肿瘤的活性, 这使得抗菌肽的研究意义越来越显得重要。

1 抗菌肽的来源和种类

1.1 昆虫抗菌肽

昆虫能对细菌的侵染作出反应, 形成一种高效抗菌和杀菌分子(抗菌肽)的快速、短暂的合成机制, 然后将其分泌到血淋巴中。这些抗菌肽具有对革兰氏阴性菌和阳性菌的广谱抗菌活性, 大多带正电荷。

1.2 两栖类抗菌肽

两栖类动物皮肤中含有各种能分泌不同生物活性分子的腺体。如非洲蟾蜍受外伤不易感染, 可能与分离得到的两种关系较近的名 Magainins 类的抗菌肽有关。

Magainins 是爪蟾产生的含 21~27 个氨基酸的一类碱性无半胱氨酸的抗菌肽, 微克分子浓度的 Magainins 就能杀死革兰氏阳性、阴性细菌、真菌和原生动物的甚至真核的肿瘤细胞, 但它们却不伤害体细胞或红细胞。不同种类的蛙可以产生多种抗菌多肽, 它们既无序列相似性又与 Magainins 不同, 但从不同种类蛙中分离的抗菌多肽都有一个共同的 Rana 区(Ranaxon): N-末端有涉及膜通透性的亲水脂 α -螺旋, C-末端有二硫键相连的两个半胱氨酸残基。

1.3 水产动物抗菌肽

1996年, Oren 等^[4]从豹鲷体上分离到一种含有 33 个氨基酸残基的抗菌肽并将其命名为 Pardaxin, 研究发现它具有比蜂毒素更强的抗菌活性和更低的人红血球溶血活性。Azumi 等^[5]从一种海鞘的血细胞中分离到抗菌肽 Haloyaminin, 这种肽在体外可抑制某些鱼 RNA 病毒和某些海水细菌的生长。Park 等^[6]从泥鳅体上分离到一个 21 氨基酸的抗菌肽 Misgurin, 具有较强的体外广谱抗菌活性且没有明显的溶血作用。Saito 等^[7]从鲑体上分离到的一个含 79 个氨基酸残基的分子与兔和牛的嗜中性白血球防御素相似。1997年 Destoumieux 等^[8]从养殖的南美白对虾的血细胞和血浆中分离了几种抗菌活性因子, 其中 3 种具有抗真菌和抗细菌尤其是抗革兰氏阳性菌的活力。

1.4 哺乳动物抗菌肽

哺乳动物中, 抗菌肽在吞噬细胞和粘膜上皮细胞表达。已经在各种脊椎动物中发现了 100 余种防御素, 防御素具有广泛的抗革兰氏阴性菌和阳性菌、真菌和一些具包膜病毒的活性。哺乳动物防御素主要有 α -防御素和 β -防御素两种。

2 抗菌肽的类型和作用机理

根据结构和功能的不同, 可把抗菌肽分为 4 类, 即: 杀菌肽(Cecropins)、防御素(Defensins)、蛙皮素(Magainin)一富含脯氨酸的抗菌肽、蜂毒素(Melittin)一富含甘氨酸的抗菌肽。这 4 种类型抗菌肽共同的特点是均为碱性多肽, N 端有多聚腺苷酸残基, C 端均酰胺化, 第二位氨基酸多为色氨酸(Try), 具两亲性结构, 分子量为 4kD 左右等。

几乎每种抗菌肽杀菌时都会造成细胞内物质的泄露, 一般认为抗菌肽杀菌机理是它们可以破坏细胞膜的

收稿日期: 2004-03-11

收修改稿日期: 2004-11-01

作者简介: 肖建光, 1979 年生, 男, 贵州遵义人, 在读研究生, 主要从事鱼类繁殖育种研究。

结构,从而导致细胞内物质的泄漏和瓦解跨膜电势,这就影响了细胞的正常生理过程,导致细胞的死亡。抗菌肽和质膜作用时采用两种主要的机制,一种是“栅桶式”机制;另一种是“毯式”机制^[9]。抗菌肽一般具有两亲性:一端疏水,一端亲水。抗菌肽疏水端有插入质膜的倾向,所以对栅桶式机制而言,多个抗菌肽分子形成管束状结构,这种结构的疏水端可以插入细胞膜中形成孔洞,以这种方式作用的抗菌肽分子中含有较多的 α -螺旋结构。在毯式机制中,抗菌肽通过其疏水的氨基酸残基和膜亲和而造成膜损伤,以这种方式作用的抗菌肽分子多含有 β -折叠结构。抗菌肽通过物理方式和质膜发生作用是其主要的抗菌机理,但随着研究的深入,人们发现抗菌肽还可以通过其它的方式产生抗菌效果,如通过抑制细胞的呼吸作用杀菌;某些富含脯氨酸的抗菌肽可与细菌的热休克蛋白结合而发挥抗菌活性。

3 水生动物抗菌肽的研究进展

水生动物抗菌肽的研究主要集中在一些甲壳类动物如蟹、蟹等上,近年也有关于鱼、虾、贝抗菌肽或类似抗菌肽物质的研究报道,这表明抗菌肽在水产养殖业方面具有潜在的应用前景。

3.1 水生甲壳动物的抗菌肽

Saito等从鲎体上分离到的一个79个氨基酸残基的分子与兔和牛的嗜中性白血球防御素相似;Pierre等^[10]从鲎血细胞中分离到的抗菌肽,采用融合蛋白方法使其基因在大肠杆菌中表达,同时避免伤害大肠杆菌,获得具有与天然抗菌肽相似的、能有效地抑制原生动物的表达产物。Chisholm等^[11]研究包括龙虾和对虾在内的8种甲壳动物的血细胞溶胞上清液对数种细菌有杀灭作用,证明其含有能杀灭细菌的因子;Schnapp等^[12]从青蟹的血细胞中分离到3种具有杀菌作用的肽。从不同种鲎的血细胞中分离到多个抗菌肽,发现它们具有与其它昆虫、蛙和哺乳类抗菌肽共同的结构特点,即由于多个精氨酸和赖氨酸残基的存在而带阳性电荷,形成两亲性二级结构,能选择性地作用于细菌外层细胞膜的某些组分如带阴离子的磷脂等,增大其渗透性而杀死或抑制细菌的生长。此外,有人从养殖的南美白对虾的血细胞中分离了几种抗菌活性因子,具有与抗菌肽相似的特点。

3.2 鱼类抗菌肽

鱼类抗菌肽研究比较晚,是近几年才开始的。以色列学者Oren等从豹鲷体上分离到的Pardaxin。此肽具有比蜂毒素更强的抗菌活性和更低的人红血球溶血活性,其作用可与其它天然的抗菌肽如蛙皮素、杀菌肽等相比。此肽具有螺旋-卷曲-螺旋的结构模式,具有与溶解哺乳类和细菌细胞的细胞毒性肽类(如蜂毒素)所共有的结构模式,能选择性地作用于细菌膜。Conlon等^[13]从海七鳃鳗的皮肤上分离到富含半胱氨酸和精氨酸的多肽,其氨基酸序列与老鼠的抗菌肽和兔的抗菌肽结构相似。Park等从泥鳅体上分离到的抗菌肽Misgurin具有较强的体外广谱抗菌活性且有明显的溶血作用,其抗菌活性是蛙皮素的2~6倍,其对细胞膜的作用机制与蛙皮素的通

道形成机制相似。低浓度形成通道,高浓度则导致溶胞。

4 抗菌肽在水产养殖上的应用前景

随着人口的增加和工农业生产的迅猛发展,全球性的环境污染日益加重,水环境出现了有机物和无机物富营养化、重金属离子和某些难降解的农药、有害化学成分富集等现象。同时养殖生产过程中产生的排泄物和残饵等超过了水环境的自净能力,进一步加剧了水环境的污染程度,因而使水产养殖品种频频发生各种细菌性和病毒性疾病。防治过程大量地使用抗生素或其它药物,破坏了水环境的微生态平衡,某些病原体对药物产生了耐药性,因而无法有效地控制疾病的发生。由于缺乏有效的防治措施,严重地制约着水产养殖业的发展。因此,加快对主要水产养殖品种免疫防御的基础研究,调动、开发其自身的防御潜力,是开展健康养殖、实现养殖业可持续发展的重要战略之一。水产动物抗菌肽的研究加深了人们对低等脊椎动物免疫防御机制的认识,为日益严重的鱼类病害防治开辟了崭新的途径。同时随着转基因技术的发展,人们有可能通过转抗菌肽基因获得抗病新品种。有理由相信,随着研究的不断深入,水产动物抗菌肽将对世界水产业的可持续发展起到重要的作用。

5 存在的问题

抗菌肽要成为药物,还要解决一系列问题。如抗菌肽提取纯化技术必须提高,因为这是限制抗菌肽生产成本的主要因素;动物源的抗菌肽来源有限,必须通过基因工程方法对其进行表达;抗菌肽的稳定性和免疫反应需要通过对抗菌肽进行分子改造使之提高。因此,只有真正阐明了抗菌肽的结构和功能的关系后,才能有的放矢地合成新的抗菌肽,为更多抗菌肽的用途提供机会。

参考文献:

- [1] Boman HG, *et al.* Antibacterial Peptides: Key Components Needed in Immunity[J]. *Cell*, 1991, 65: 205~207.
- [2] 许玉澄,张双全,戴祝英.家蚕抗菌肽的抗癌作用[J].*动物学研究*,1998,19(4):263~268.
- [3] Robert E W, Homcock, Lehrer R. Cationic peptides: a new source of antibiotic[J]. *Trends Biotechnol*, 1998, 16: 82~88.
- [4] Oren Z, Shai Y. A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from Moses sole fish[J]. *Eur J Biochem*, 1996, 237: 303~310.
- [5] Azumi K, *et al.* Inhibitory effect of halocyanine, an antimicrobial substance from ascidian hemocytes, on the growth of fish viruses and marine bacteria[J]. *Experientia*, 1990, 46(10): 1066~1068.
- [6] Park C B, Lee J H, Park I Y, *et al.* A novel antimicrobial peptide from the loach, *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. *FEBS Lett*, 1997, 14: 411(2~3): 173~178.

(下转第55页)

均值为 6.0 mg/L, 夏季高于春季, IV 站高于 II 站, 反映出该水体有机物质的含量较高。云龙湖水库的 COD 高于江苏省 48 座大中型水库 COD 的平均值(4.2 mg/L)^[5]。

3.1.2 碱度和硬度 云龙湖水库 CO_3^{2-} 、 HCO_3^- 的存在, 是造成水体碱度的主要原因。春、夏两季总碱度平均值为 110.2 mg/L, 在养殖水体适宜范围 50~150 mg/L 内; 水体的总硬度由除碱金属外的所有金属(以钙、镁为主)离子构成, 春、夏两季总硬度平均值为 181.2 mg/L, 按天然水硬度分类标准, 云龙湖水库属中等软水, 高于水产养殖适宜范围上限 150 mg/L^[6]。由于总硬度大于总碱度, 表明水体中有永久硬度存在, 不存在负硬度。

3.1.3 主要营养元素 云龙湖水库主要营养元素中, 春夏两季总氮含量平均为 1.41 mg/L, 硝态氮含量平均为 0.05 mg/L, 氨氮含量平均为 0.54 mg/L; 总磷含量平均为 0.224 mg/L, 可溶性磷平均为 0.140 mg/L。按照水库渔业营养类型划分标准^[7], 总氮、总磷均达到富营养标准。云龙湖水库平均水深 2.5 m, 为浅水湖泊型水库, 亦具有浅水湖泊的一些特征, 按照湖泊分类的有关标准: $N:P < 16:1$ 为富营养^[8]。云龙湖水库的 $N:P = 6.3:1$, 因此可判定该水库为富营养型水库。

3.2 浮游植物初级生产力评价

水体中 N、P 含量是影响浮游植物生长的主要营养元素, 对于大多数水库而言, P 是浮游植物生长的主要限制因素。而云龙湖水库由于受上游

农业面源污染、城市生活污水以及投饲精养渔业的影响, 水体中 P 含量较高, TP 达 0.224 mg/L, 有利于浮游植物的生长。而同期测得的浮游植物生物量仅为中等水平, 可能与水库大量放养鲢、鳙的直接滤食作用有关^[9]。浮游植物水柱日毛产量达 5.08 mgO₂/m²·d, 按照水库渔业营养类型划分标准, 浮游植物初级生产力大于 3 gO₂/m²·d 即达富营养标准, 因此也可判定该水库为富营养型水库。

参考文献:

- [1] 戴泽贵, 等. 中华人民共和国水利部标准, 水库渔业资源调查规范[M]. 北京: 标准出版社, 1996.
- [2] 张觉民, 等. 内陆水域渔业自然资源调查手册[M]. 北京: 科学出版社, 1991.
- [3] 章宗涉, 黄祥飞. 淡水浮游生物研究方法[M]. 北京: 农业出版社, 1991.
- [4] 黄漪平, 等. 太湖水环境及其污染控制[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [5] 万成炎, 吴晓辉, 朱爱民, 等. 江苏省大中型水库水质的理化现状及其渔业评价[J]. 水利渔业, 2003, 23(1): 43~45, 62.
- [6] 湛江水产专科学校主编. 淡水养殖水化学[M]. 北京: 农业出版社, 1979.
- [7] 戴泽贵, 等. 水库渔业营养类型划分标准[M]. 北京: 标准出版社, 1998.
- [8] 黄玉瑶. 内陆水域污染生态学[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [9] 刘建康, 谢平, 等. 用鲢鳙直接控制微囊藻水华的围隔试验和湖泊实践[J]. 生态科学, 2003, 22(3): 193~198. (责任编辑 万月华)

(上接第 5 页)

- [7] Noga E J, Kaw abatas, Shigenaga T, *et al.* A novel big defensin identified in horseshoe crab hemocytes; isolation, amino acid sequence, and antibacterial activity[J]. J Biochem, 1995, 117: 1131~1137.
- [8] Detoumieux D, *et al.* A new family of antimicrobial peptides isolated from the penaeus vannamei (Decapode)[J]. J Biol Chem, 1997, 272: 28 398~28 406.
- [9] Oren Z, Shai Y. A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from moses sole fish pardachirus marmoratus[J]. Eur J Biochem, 1996, 237(1): 303~310.
- [10] Pierce J C, Maloy W L, Saivadorl, *et al.* Recombinant expression of the antimicrobial peptide polyphemusin and its activity against the protozoan oyster pathogen [J]. Mol Mar Biol Techical, 1997, (6): 248~259.
- [11] Chisholm J R S, Smith V J. Comparison of antibacterial activity in the hemocytes of different crustacean species[J]. Comp Biochem Physiol A, 1995: 110A(1): 39~45.
- [12] Schnapp D, Kemp G D, Smith V J. Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin-7, from the hemocytes of the shore crab[J]. J Biochem, 1996, 240: 532~539.
- [13] Conlon J M, Sowersa. Isolation of a peptide structurally related to mammalian corticostatins from the lamprey[J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 1996, 114(2): 133~137. (责任编辑 万月华)