

## \* 研究简讯 \*

# 家蚕抗菌肽 CM<sub>4</sub> 组分杀菌机理的 激光共聚焦显微镜观察 \*

徐进署 张双全 \*\*

南京师范大学生命科学学院, 南京 210097

**摘要** 报道了家蚕抗菌肽对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌的杀菌作用。用抗菌肽处理大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,与对照组相比,它们的 OD 值随时间明显下降,平板培养克隆数减少。以荧光素 FITC 标记抗菌肽作用于大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌等细菌,用激光共聚焦扫描显微镜观察,发现抗菌肽迅速包围菌体,密集于细胞膜,损伤膜的完整性,出现大小不等的孔洞,菌体断裂,最后死亡。说明细菌膜结构是抗菌肽 CM<sub>4</sub> 攻击的首要靶位点。

**关键词** 抗菌肽 CM<sub>4</sub> 大肠杆菌 金黄色葡萄球菌 绿脓杆菌 激光共聚焦扫描

抗菌肽是昆虫先天免疫系统的重要成分。昆虫在受到刺激或非刺激状态下能迅速产生一系列抗菌物质参与机体的免疫应答反应,其中最重要的是抗菌肽。抗菌肽是一类分子量小、具广谱抗菌活性的蛋白质,来源非常广泛,昆虫、两栖类、哺乳类及植物体内都有分布,可在细菌的质膜上形成通道而导致菌体的破坏<sup>[1]</sup>,但对真核细胞无毒害作用。Cecropins 是昆虫免疫诱导的抗菌肽<sup>[2,3]</sup>,对许多革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌有杀灭作用。

黄自然等<sup>[4]</sup>通过诱导免疫柞蚕分离纯化出柞蚕抗菌肽,对 113 种细菌有杀灭作用。家蚕抗菌肽结构与天蚕素(cecropin)相似,具有两亲性的  $\alpha$ -螺旋结构,对多种细菌有杀伤作用。张双全等<sup>[5]</sup>报道家蚕抗菌肽 CM<sub>4</sub> 能破坏癌细胞,使癌细胞的微绒毛减少,造成癌细胞出现大量孔洞,最终成为碎片。

实验已经证明抗菌肽对威胁着人体健康的金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌等致病细菌有抑制杀伤作用。我们借助激光共聚焦扫描显微镜观察了家蚕抗菌肽对上述致病细菌的作用过程。以期探讨抗菌肽的杀菌作用机理。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种

大肠杆菌(*Escherichia coli*) K<sub>12</sub>D<sub>31</sub>由瑞典斯德哥尔摩大学 Boman 教授赠送,南京师范大学

2000-11-13 收稿,2001-04-02 收修改稿

\* 国家自然科学基金资助项目(批准号:39770117)

\*\* 联系人

生命科学学院生物化学与分子生物学实验室保存。金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 均由南京师范大学生命科学学院微生物研究室保存。

### 1.2 家蚕抗菌肽 CM<sub>4</sub> 的分离纯化、荧光标记

大肠杆菌对家蚕蛹的诱导及免疫血淋巴的收集按照文献[6]的方法进行。抗菌肽 CM<sub>4</sub> 组分的分离纯化及活性鉴定按文献[7]的方法进行。抗菌肽 CM<sub>4</sub> 的荧光标记采用 Park 等<sup>[8]</sup>的方法。

### 1.3 孔穴法检测抗菌肽抑菌活性

融化 10 mL LB 固体培养基, 冷却至 45℃ 左右, 按 100:1 的比例加入对数生长期的绿脓杆菌, 混匀, 倒入直径 9 cm 的平皿中, 迅速铺平, 待凝固后, 于超净台内用灭过菌的不锈钢打孔器 (直径 3 mm) 打孔。孔内加满抗菌肽溶液, 置 36℃ 下培养, 第 2 天观察结果。

### 1.4 激光共聚焦显微镜观察

大肠杆菌、绿脓杆菌和金黄色葡萄球菌于培养皿中涂布培养过夜, 挑取细菌克隆于 2 mL LB 液中, 振荡培养, 分别收集对数期的上述 3 种细菌培养液, 于 8000 r/min, 28℃, 离心 4 min。去掉上清, 用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4, 含 150 mmol/L NaCl) 洗 2 次。重悬浮于相同的磷酸缓冲液中, 菌液浓度约为  $1 \times 10^{10}$ /mL。取少许菌液涂于用多聚赖氨酸处理的载玻片上, 加适量 FITC 标记的抗菌肽后, 用 Bio-Rad MRC-1024 激光共聚焦扫描显微镜观察抗菌肽与细胞的结合、分布及杀伤细胞的过程。该显微镜由南京师范大学生命科学学院实验中心提供, 其 KeAr 激光发生器的激光波长为 488 nm, 观察其 495 nm 发射光, 图像经 Laser sharp 软件处理。

### 1.5 抗菌肽对细菌生长的影响

(1) 抗菌肽对细菌作用后 OD 值的变化。接种的大肠杆菌于 37℃ 下, 振荡培养至对数期, 加入抗菌肽, 使其终浓度为 0.55 mg/mL, 对照组加等量的无菌水。每隔 20 min 测其 OD 值。金黄色葡萄球菌也作同样处理。

(2) 抗菌肽对细菌作用的克隆数。大肠杆菌培养至对数期, 用 10 mmol/L PBS (pH 7.4) 洗涤, 保持菌液浓度为  $1 \times 10^7$  个/mL, 取菌液 150  $\mu$ L 与抗菌肽混合培养, 抗菌肽终浓度为 2 mg/mL, 不同时期取其稀释 1000 倍, 涂布固体平板培养, 37℃ 下培养过夜后计算菌落数。金黄色葡萄球菌亦作同样处理。

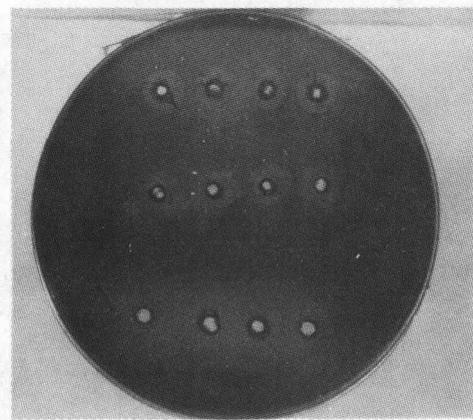


图 1 家蚕抗菌肽 CM<sub>4</sub> 对绿脓杆菌的抑菌效应

## 2 结果和讨论

### 2.1 孔穴法检测抗菌肽 CM<sub>4</sub> 对绿脓杆菌的抑制作用

抗菌肽 CM<sub>4</sub> 能抑制病原菌绿脓杆菌的生长繁殖, 如图 1, 由于抗菌肽在培养基中的渗透, 导致平板上出现抑菌圈; 随着抗菌肽量的增加, 抑菌圈不断扩大, 最后连成一片, 呈明亮的空白斑状。结果表明了抗菌肽 CM<sub>4</sub> 具有抗绿脓杆菌的活性。

### 2.2 激光共聚焦显微镜观察

为了检验抗菌肽与大肠杆菌、绿脓杆菌和金黄色葡萄球菌作用的靶位点, 用 FITC 荧光标记物偶联抗菌肽, 在 488 nm 激光的激发下, 该偶联物发射出绿

色荧光. 标记的荧光素染料 FITC 对抗菌肽的活性不产生任何影响, 其分子本身也不具有抗菌活性. 我们发现, FITC 标记的抗菌肽能迅速包围菌体, 聚集在细胞质膜表面.

对大肠杆菌来说, 观察表明 FITC 标记抗菌肽首先大量地聚集于细胞膜上, 使整个细菌呈一个明亮的短杆. 抗菌肽结合的密度并不是均匀的, 杆状的细菌两端结合的抗菌肽分子要多一些. 随着作用时间的延长, 结合 FITC 抗菌肽的膜碎片脱落, 菌体亮度逐渐减弱. 细菌表面出现了破损、凹陷, 菌体内容物外流, 散布在四周, 细菌中间出现断痕, 膜结构被破坏, 最后细菌崩解, 形成一堆支离破碎的碎片残骸(图 2(a)~(h)). 较之于大肠杆菌, 绿脓杆菌和金黄色葡萄球菌膜与抗菌肽 CM<sub>4</sub> 的结合能力有所降低. 在其细胞膜明显可以看出深浅不同的亮度区. 抗菌肽分子聚集在金黄色葡萄球菌膜上, 造成膜大面积的破损, 最后形成了无细胞形态的碎片(图 2(i)~(k)). 图 2(l)~(o) 表示了抗菌肽对绿脓杆菌的作用. 可以看出, 抗菌肽把长长的绿脓杆菌截断, 促使残裂的菌体慢慢瓦解. 而这些结果表明抗菌肽首先作用于细菌的膜.

可见, 中国家蚕抗菌肽杀菌的方式也和 cecropin 类似, 抗菌肽首攻的靶位点是细胞膜, 通过形成孔洞或渗透膜通透性来杀死细菌. 但激光共聚焦断层扫描显示, 抗菌肽 CM<sub>4</sub> 分子也能穿过膜与细胞内部的结构偶

合, 形成了如图 2 所示的细胞内腔的光亮区域(图 2(i), (l)). 推测细胞内部也有抗菌肽 CM<sub>4</sub> 的作用位点. 抗菌肽进入细胞内, 与生物大分子或细胞器相互作用, 干扰了它们正常功能的发挥, 引起物质和能量代谢紊乱, 细胞衰亡. 在抗菌肽与绿脓杆菌作用的过程中, 往往可以发现杆菌从一头断裂成两截. 显然由于抗菌肽分子的作用, 细菌很难保持其完整性. 从另一方面看, 抗菌肽分子是以聚集体的形式发挥功能的, 当抗菌肽集合体结合于细菌膜上时, 导致其他分子迅速集结环绕菌体切断胞膜, 使其断成两节.

### 2.3 抗菌肽对细菌生长的影响

抗菌肽对细菌的抑制和杀灭作用可用菌液光密度值的变化来检测. 当细菌悬液加入抗菌肽后, 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌悬液在 630 nm 的光密度值始终比对照组低(图 3, 4). 两者的下降幅度不同, 较之于金黄色葡萄球菌, 大肠杆菌下降的幅度更大. 在前 25 min 里, 大肠杆

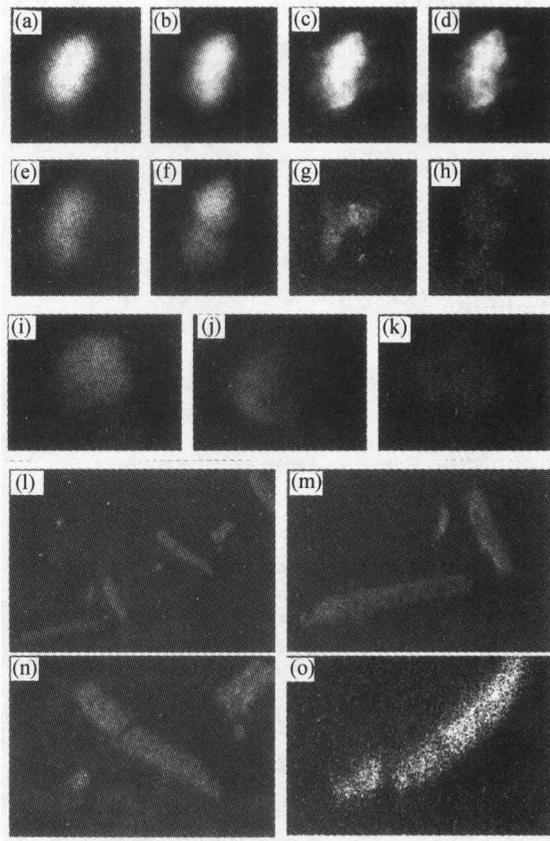


图 2 抗菌肽 CM<sub>4</sub> 对细菌作用的激光共聚焦扫描观察 (a)~(h) 抗菌肽对大肠杆菌的作用过程, (a) 菌体被抗菌肽包围, (b) 抗菌肽密集, (c)、(d) 细胞膜开始破裂到出现孔洞, (e)、(f) 膜开始松散, 中间出现断痕, (g) 内容物泄露, 胞膜塌陷, (h) 零散的膜碎片. (i)~(k) 为金黄色葡萄球菌在抗菌肽作用下逐步破坏的过程. (l)~(o) 被抗菌肽破坏后的绿脓杆菌, (l) 包括了各种状态的菌体, (m) 抗菌肽刚结合菌体, 形态完整, (n) 菌体断裂, (o) 正在崩解为碎片

菌的 OD 值随时间而下降,之后,略有回升,但还是与对照组相差颇大. 这些结果表明抗菌肽 CM<sub>4</sub> 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌有杀伤作用,但两者对抗菌肽的敏感性存在差异,大肠杆菌对抗菌肽 CM<sub>4</sub> 的敏感性较高.

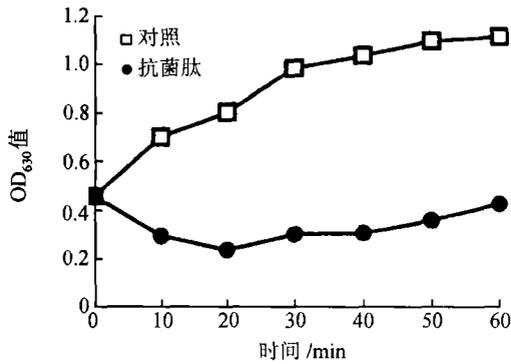


图 3 抗菌肽对大肠杆菌生长的影响

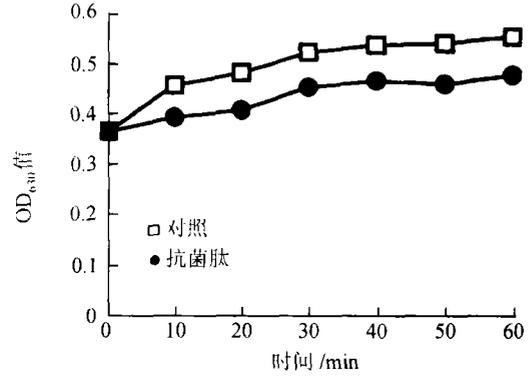


图 4 抗菌肽对金黄色葡萄球菌生长的影响

图 5 和图 6 显示,在对数生长期的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌悬液中加入抗菌肽后,其对细菌的杀伤作用迅速表现出来. 约 20 min 左右对照组的克隆数骤然上升,加入抗菌肽后细菌的克隆数越来越少.

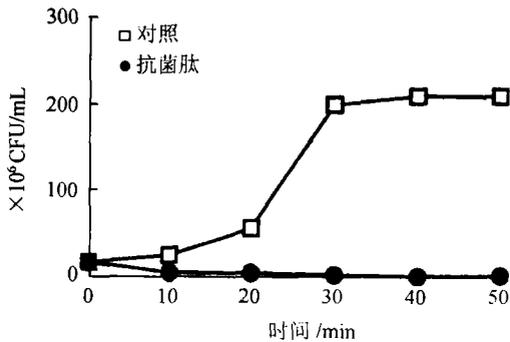


图 5 抗菌肽对大肠杆菌菌落生长影响

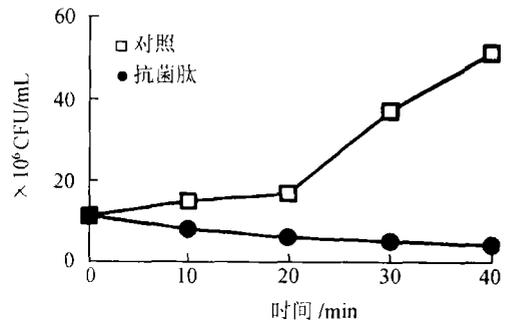


图 6 抗菌肽对金黄色葡萄球菌菌落生长影响

这些结果表明抗菌肽 CM<sub>4</sub> 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌都具有杀伤作用. 但在表现方式上存在差异,从 OD 值变化曲线看,抗菌肽处理大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的生长变化曲线总是落后于对照组,这是它们的共同之处. 它们的不同在于加入抗菌肽后,大肠杆菌的 OD 值先是下降,然后稍有回升;抗菌肽处理金黄色葡萄球菌的 OD 值尽管也落后于对照组,但没有下降的趋势,总体上仍然上升. 这些现象说明,抗菌肽对金黄色葡萄球菌的杀伤活性可能与它的剂量有关,或者抗菌肽对金黄色葡萄球菌的杀伤性较弱. 但图 6 却显示,抗菌肽处理与否,金黄色葡萄球菌的成活菌落数目相差巨大,在前 30 min 内抗菌肽对细菌的破坏性达到相当近似的水平. 因此,可以认为抗菌肽 CM<sub>4</sub> 抗金黄色葡萄球菌不完全是通过溶解细胞这一途径,可能还存在其他的杀菌方式.

大多数研究表明,昆虫抗菌肽能杀死许多有害细菌、真菌、原虫及病毒等<sup>[9]</sup>. 抗菌肽种类

繁多,不可能用统一的模式来解释它们的杀菌机制,不同的分子结构有不同的作用方式. 家蚕抗菌肽属于带两性亲水- $\alpha$ -螺旋结构类别,这类家族还有 cecropins<sup>[10]</sup>, magainins<sup>[11]</sup>等. 它们都表现为 N-末端亲水、C-末端疏水的高级结构. 近来对这一家族的几种抗菌肽组分的研究显示,抗菌肽可以通过形成孔洞和增加膜的渗透性亦或破坏膜结构的方式杀死细菌. 我们研究发现,抗菌肽可以进入细胞,与其内部结构结合. 激光共聚焦断层扫描显示,抗菌肽跨膜进入细胞内部,导致细胞内抗菌肽大量分布. 从抗菌肽对细菌的 OD 值及菌落生长的影响来分析,认为中国家蚕抗菌肽杀灭金黄色葡萄球菌时,可能是通过进入细胞内部干扰阻止了正常的细胞代谢从而导致细胞死亡. 这一问题还在进一步研究中.

### 参 考 文 献

- 1 Christensen B, et al. Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 5072
- 2 Boman H G, et al. Cell-free immunity in insects. *Annu Rev Microbiol*, 1987, 41: 103
- 3 Boman H G, et al. Cell-free immunity in cecropia: A model system for antibacterial proteins. *Eur J Biochem*, 1991, 201: 23
- 4 黄自然, 等. 柞蚕抗菌肽的抑菌效应. *科学通报*, 1986, 14: 107
- 5 张双全, 等. 抗菌肽 CM<sub>4</sub> 抗 K562 癌细胞的超微结构研究. *生物化学与生物物理进展*, 1997, 24(2): 159
- 6 戴祝英, 等.  $\gamma$ -射线及大肠杆菌诱导蓖麻蚕产生抗菌物质的研究. *南京师范大学学报(自然科学版)*, 1988, 1: 88
- 7 屈贤铭, 等. 经聚肌胞核苷酸诱导家蚕蛹血淋巴中六种抗菌肽的分离纯化. *生物化学和生物物理学报*, 1986, 18(3): 284
- 8 Park C B, et al. Mechanism of action of the antibacterial peptide buforin II: Buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 244: 253
- 9 Boman H G. Antibacterial peptides: Key component needed in immunity. *Cell*, 1991, 65: 205
- 10 Steiner H, et al. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 1981, 292: 246
- 11 Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 5449