

抗菌肽 CM₄ 组分对寄生曲霉抗性 机制的研究*

徐进署 张双全**

南京师范大学生命科学学院, 南京 210097

摘要 研究了家蚕抗菌肽对寄生曲霉的杀菌作用. 将用荧光素标记的抗菌肽作用于寄生曲霉, 在激光共聚焦显微镜及扫描电子显微镜下观察, 发现抗菌肽能迅速地将菌体包围, 作用于细胞膜, 产生许多小孔并进入胞内, 细胞壁局部结构破裂, 细胞膜破损, 胞浆内容物大量外泄, 细胞解体, 最后菌体变成空囊而死亡. 由于真菌特殊的细胞壁结构, 能阻止抗菌肽与膜结合. 进一步研究了抗菌肽对寄生曲霉原生质体的作用, 发现抗菌肽有效地抑制了原生质的恢复生长, 降低了再生率.

关键词 抗菌肽 CM₄ 寄生曲霉 激光共聚焦显微镜 抗真菌作用

自 Boman 等^[1]发现并首先测定了惜古比天蚕 (*Hyalphora cecropia*) 抗菌肽一级结构以来, 抗菌肽的广谱抗菌作用和抗癌作用研究在国际上引起了许多学者的重视. 研究表明, 昆虫抗菌肽不但能杀灭细菌、病毒、原虫和癌细胞, 而且还能杀伤真菌.

抗菌肽抗真菌的有关研究报道始见于 20 世纪 90 年代初期, Iijima 等^[2]从麻蝇幼虫血淋巴分离出抗真菌小肽, 能抑制真菌白色假丝酵母 (*Candida albicans*) 生长, 命名为 AFP (anti-fungal peptide). 此后, 人们又从蝎子 (*Androctonus australis*) 的血淋巴中分离出由 25 个氨基酸残基组成的抗真菌组分 Androctonin. 其对链格孢 (*A. brassicola*) 和大刀镰孢 (*F. culmorum*) 有明显抗菌活性, 但对另外许多菌株的杀菌性较低^[3], 因而认为抗菌肽的抗菌活性还存在作用对象的差异性. 为了寻找高效的抗真菌物质, Lee 等^[4]用人工改造分子的手段, 分别截取天蚕素 A 和蜂毒素分子的片段, 合成杂合肽分子 Cecropin-Melittin (CA-ME). 杂合肽 CA-ME 不但无细胞毒性, 而且大大提高了抗真菌活性. 迄今为止, 已发现 Cecropin A, Mytimycin, Thanatin 和 Drosomycin 等生物活性小肽都有抗真菌的作用, 而对人体细胞无明显毒性, 抗菌肽有可能发展成为潜在的抗真菌试剂.

中国家蚕抗菌肽已显示对多种细菌和癌细胞有杀伤作用^[5], 但其抗真菌的研究还未见报道. 我们采用激光共聚焦扫描断层分析及扫描电子显微镜亚显微结构观察, 研究了家蚕抗菌肽对寄生曲霉的抗性作用, 这有益于更深入地阐明抗菌肽的作用方式和作用机理, 挖掘抗菌肽的潜在功能.

2001-04-10 收稿, 2001-05-23 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目 (批准号: 39770117)

** 联系人, E-mail: jsxu@263.net

1 材料及方法

1.1 抗菌肽 CM₄ 的分离纯化、鉴定和标记

蚕蛹的诱导参照戴祝英等^[6]的方法进行. 抗菌肽的分离纯化参照文献^[7]. 抗菌肽 CM₄ 组分的生物活性检测方法见文献^[8]. FITC 荧光标记抗菌肽见文献^[9].

1.2 抗菌肽对寄生曲霉生长发育的影响

寄生曲霉孢子制成平板后打孔. 抗菌肽浓度为 10 μg/mL, 取 15 μL 加入孔中, 28℃ 下培养. 24 h 后, 再加 10 μL 抗菌肽溶液于相同的孔中, 相同条件下继续培养. 3 d 后观察结果.

1.3 抗菌肽对真菌作用的激光共聚焦显微镜观察

将寄生曲霉孢子置于孢子萌发液(0.1% 葡萄糖和 0.05% (NH₄)₂SO₄)中振荡培养 24 h, 用 10 mmol/L 的 PBS 洗 2 次, 加适量荧光标记抗菌肽混匀, 用激光共聚焦显微镜观察(激发光 488 nm, 发射光 495 nm). 同时观察非萌发孢子.

1.4 抗菌肽对真菌作用的超微结构观察

将寄生曲霉孢子制成孢子悬液(浓度约为 1.0 × 10⁵ mL). 离心 9000 r/min, 4 min, 去上清, 加等量孢子萌发液振荡培养 24 h 后, 再加抗菌肽液于萌发孢子中, 对照组不加抗菌肽. 24 h 后, 按常规扫描电子显微镜样品制备过程进行样品制备, 用日本明石 SX-40 型扫描电子显微镜观察.

1.5 抗菌肽对寄生曲霉原生质体再生的抑制

寄生曲霉原生质体的制备参照文献^[10].

抗菌肽抑制寄生曲霉原生质体再生实验: 取适当稀释原生质体溶液 0.3 mL, 加入到 PRCM (原生质再生完全培养基, 含 0.6 mol/L KCl, 0.05% NaCl, 0.005% MgSO₄ · 7H₂O, 0.03% KH₂PO₄, 0.6% peptone, w/v) 平板上, 均匀涂布, 30℃ 静止培养. 为避免菌丝碎片再生的干扰, 用无菌水对原生质体作相同倍数的稀释, 按以上方法培养. 经无菌水处理, 原生质体因低渗而崩解. 因此, 两者的差与原生质体总数的比即为再生率.

抗菌肽对原生质体再生的影响: 取上述稀释后的原生质体溶液 0.3 mL 分别与浓度为 1 mg/mL 的 20, 40, 60, 80, 100, 200 μL 抗菌肽溶液混合, 再涂 PRCM 平板, 30℃ 培养. 以上实验同时进行, 3 d 后观察结果.

2 结果

2.1 抗菌肽 CM₄ 对寄生曲霉生长的影响

抗菌肽 CM₄ 能杀死真菌. 从图 1 可以看出, 随抗菌肽的扩散, 寄生曲霉在生长过程中出现了明显的抑菌圈, 含萌发孢子培养板中(b)的抑菌圈比非萌发孢子培养板(a)中略大, 抑菌圈的边界亦清晰可见. 说明抗菌肽抑制了寄生曲霉的生长, 且对萌发孢子的破坏性更大.

2.2 抗菌肽作用于真菌萌发孢子的激光共聚焦显微镜观察

荧光标记抗菌肽分别与非萌发和萌发真菌孢子进行反应后的激光共聚焦显微镜观察结果见图 2.

2.3 抗菌肽对寄生曲霉作用的扫描电子显微镜观察

图 3 显示在相同条件下, 抗菌肽处理和未处理的真菌孢子不同. 抗菌肽处理的真菌孢子

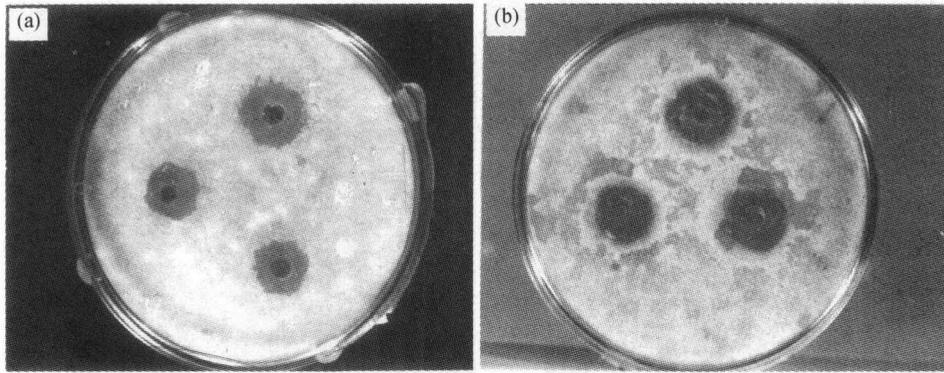


图 1 抗菌肽 CM₄ 对寄生曲霉生长的影响

(a) 非萌发孢子培养板; (b) 萌发孢子培养板

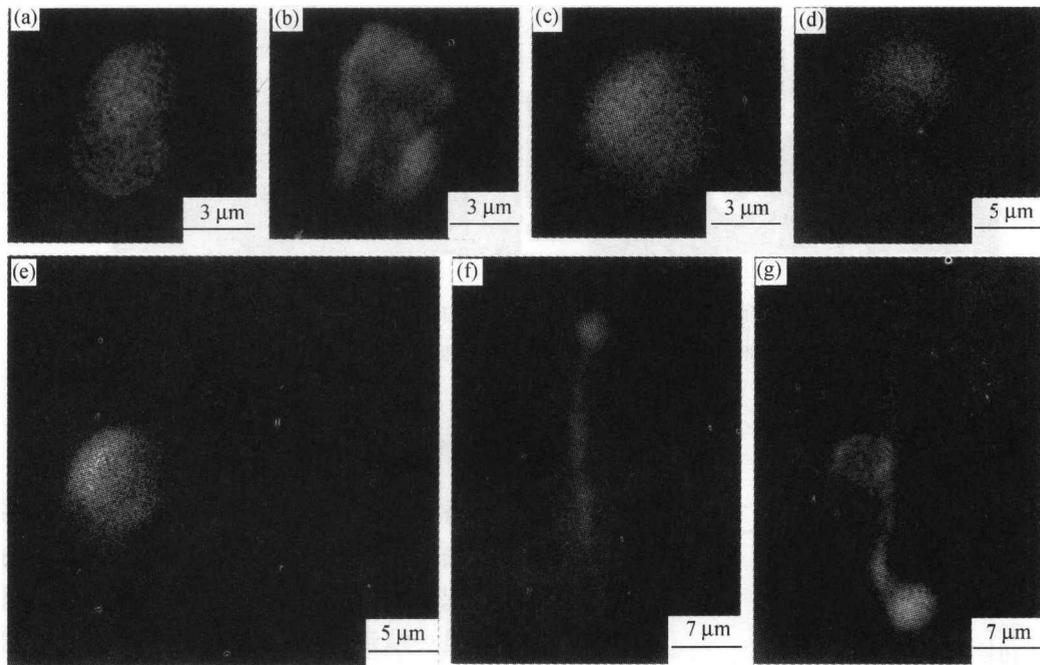


图 2 抗菌肽 CM₄ 作用于寄生曲霉的激光共聚焦显微镜观察

(a) 萌发孢子聚集了大量抗菌肽分子; (b) 萌发孢子被损坏, 内容物外泻; (c~e) 孢子被抗菌肽破坏时的各种状态;

(d) 完整的孢子; (e) 空囊化及碎片; (f, g) 抗菌肽结合于菌丝体, 萌发顶端结合更多

形状不规则、破损严重, 对照组则形状完好。

2.4 抗菌肽对寄生曲霉原生质体再生的抑制

抗菌肽能破坏寄生曲霉原生质体的再生, 由于抗菌肽的加入导致原生质体再生率下降(图 4)。结果显示, 随着抗菌肽量的增大, 原生质体再生率逐渐减小。

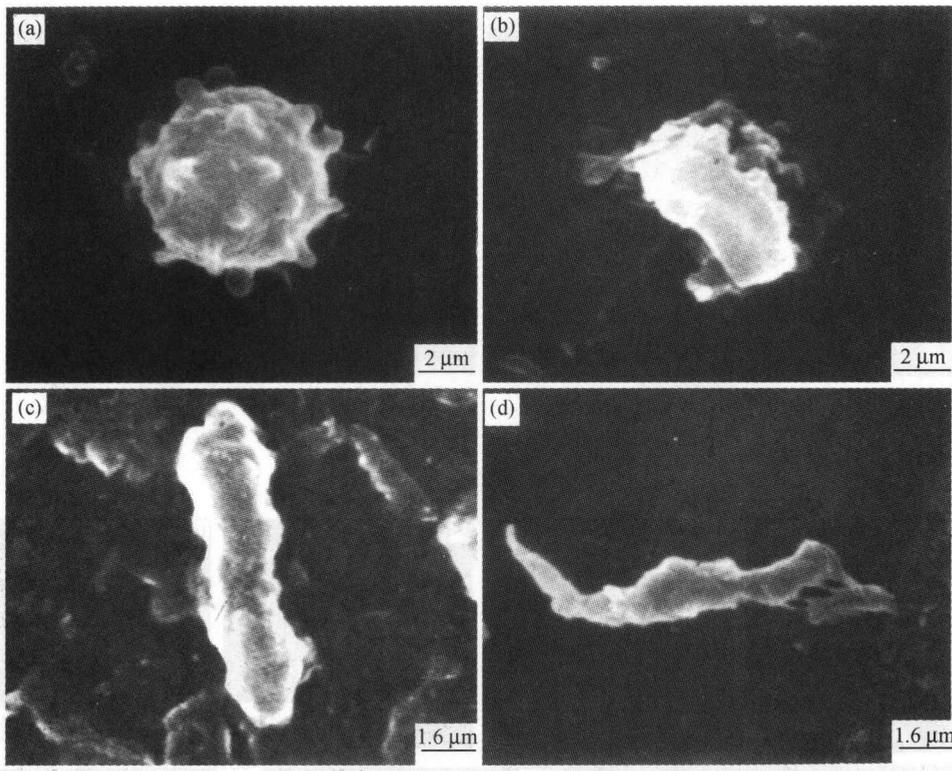


图 3 抗菌肽 CM₄ 对寄生曲霉作用的扫描电子显微镜观察结果

(a) 对照组,寄生曲霉孢子;(b) 抗菌肽处理 24 h 孢子;(c) 对照组,寄生曲霉萌发孢子;(d) 抗菌肽处理 24 h 的萌发孢子

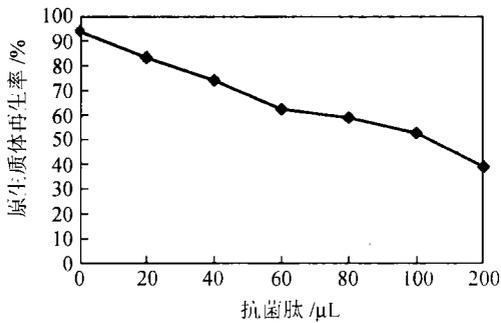


图 4 抗菌肽对寄生曲霉原生质体再生的影响

3 讨论

家蚕抗菌肽 CM₄ 的分子结构与 Cecropin 类似, 具有两亲的 α -螺旋结构区域. 推测该结构在抗菌活性中起重要作用. Boman 等^[11]曾认为抗菌肽的结构都是一端亲水, 一端疏水, 借疏水端插入质膜引起膜的改变. 现普遍认为, 抗菌肽通过两种途径达到杀菌目的: 一是靠静电作用结合病原菌; 二是形成孔洞或离子通道破坏细胞的结构^[12].

寄生曲霉的生长能被抗菌肽抑制显而易见, 本实验中我们探索了一种新的方法, 即孔穴法检测抗菌肽的抗真菌活性. 实验发现, 抗菌肽对寄生曲霉的孢子和菌丝都有破坏, 而抗菌肽对萌发状态时孢子生长的抑制作用更强.

与细菌不同, 真菌属于真核生物, 具有真正的细胞核和独特的细胞壁结构. 抗菌肽对真菌是否存在迥异于细菌的作用机制还不能明确定论. 本实验中, 借助激光共聚焦显微镜直接观察到抗菌肽将真菌孢子包围, 在很短的时间内造成胞膜不同程度的凹陷、穿孔; 随着小孔的

扩大,大量细胞内容物外流,形成许多空泡。Lee 等^[12]也观察到这一现象,他用人工合成的杂合肽 CM-ME 处理真菌孢子原生质体,发现真菌细胞膜和细胞被破坏,无法保持正常的细胞形态,表明抗菌肽对细胞质膜起作用,形成膜上孔洞而达到杀菌目的。

在真菌的萌发时期,抗菌肽表现最强的杀伤活性。抗菌肽对真菌的作用不但表现出生长状态的差异,而且也表现种属的差异。Cecropin A 在较低的浓度下能杀死串珠镰孢 *F. moniliforme* 的萌发孢子和非萌发孢子,但即使在很高的浓度下,CecropinA 也只能杀死黄曲霉 *A. flavus* 的萌发孢子,对非萌发孢子没有作用。CM₄ 处理寄生曲霉 *A. parasiticus* 的萌发孢子及非萌发孢子的扫描电子显微镜观察及孔穴抑真菌试验表明,萌发孢子对抗菌肽更敏感。De Lucca 等^[13]发现,黄曲霉的孢子能产生一种胞外酶,对抗菌肽有水解作用,而孢子萌发时胞外酶消失;串珠镰孢根本不产生胞外酶,所以对抗菌肽没有水解作用。

抗菌肽与寄生曲霉原生质体作用的实验表明,原生质体的再生率随抗菌肽量的增大而下降,扫描电子显微镜观察抗菌肽作用萌发孢子,孢子破损严重,一端因萎缩变尖,另一端断裂破碎,显然抗菌肽主要作用于膜。另一方面,这也说明细胞壁的存在阻碍了抗菌肽与真菌的作用。当孢子萌发时,细胞变化给抗菌肽与膜结合提供了更多的机会和位点^[14]。除了作用于膜以外,抗菌肽分子还可以跨过膜进入细胞内,与内部的细胞器或大分子发生作用。激光共聚焦断层截面扫描显示,真菌细胞内部聚集了大量抗菌肽分子。特别是图 2(f)和(g)说明,抗菌肽不但能作用于细胞内部结构,而且更容易作用于正在生长的真菌。显然,抗菌肽具有多种方式来抑制杀死真菌细胞,如我们发现抗菌肽 CM₄ 分子能与真菌酵母的 DNA 和 RNA 结合,导致核酸断裂(结果未发表)。抗菌肽的作用机制研究正日益受到重视,自然界存在抗真菌肽也是可以理解的,因为生物体必须时时抵御真菌的侵袭。正是基于这样一种防御机制的考虑,抗菌肽有可能成为一种潜在的抗真菌药物。

参 考 文 献

- 1 Boman H G, et al. Immune and injury response in *Cecropia pupaema*: Isolation and comparison of protein synthesis *in vivo* and *in vitro*. *Insect Biochemistry*, 1981, 11: 33
- 2 Iijima R, et al. Purification, characterization, and cDNA cloning of an antifungal protein from the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* (Flesh Fly) larvae. *J Biol Chem*, 1993, 268(16): 12055
- 3 Ehret-Sabatier L, et al. Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. *J Biol Chem*, 1996, 271(47): 29537
- 4 Lee D G, et al. Design of novel analogue peptides with potent fungicidal but low hemolytic activity based on the cecropin A-melittin hybrid structure. *Bioch Mol Biol Internal*, 1997, 43(3): 489
- 5 张双全,等. 抗菌肽 CM₄ 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. 大肠杆菌诱导家蚕蛹免疫血淋巴中抗菌物质的分离纯化与鉴定. *南京师大学报(自然科学版)*, 1988, 11(1): 88
- 7 屠益增,等. 家蚕抗菌肽 CM₂Ph₁ 等分离、纯化、结构及其性质的研究. *中国科学, B 辑*, 1989, 32: 474
- 8 Hultmark D, et al. Insect immunity: Isolation and structure of cecropin D and minor antibacterial components for *cecropia pupae*. *Eur J Biochem*, 1982, 127: 207
- 9 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, 244(1): 253
- 10 贾盘兴,等编著. *微生物遗传实验技术*. 北京: 科学出版社, 1992. 324
- 11 Boman H G. Antibacterial peptides: Key component needed in immunity. *Cell*, 1991, 65: 205
- 12 Lee D G, et al. CecropinA-melittin hybrid peptide exerts its antifungal effects by damaging on the plasma membranes of *Trichosporon beigelii*. *Biotechnology Letter*, 1998, 20(3): 211
- 13 De Lucca A J, et al. Fungicidal activity of cecropin A. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 41(2): 481
- 14 Bland J M, et al. Identification of cecropin A proteolytic cleavage sites resulting from *Aspergillus flavus* extracellular protease(s). *J Agric Food Chem*, 1998, 45: 5324