

# 中国林蛙皮肤抗菌肽基因的 cDNA 克隆及抗菌、抗癌和溶血活性的测定

虞凤慧, 张丽芳, 李俊峰, 李晓帆, 付欣, 尚德静

辽宁省生物技术与分子药物研发重点实验室, 辽宁师范大学生命科学学院, 大连 116029

**摘要:** 采用 RT-PCR 和 3'RACE 方法, 从中国林蛙皮肤总 RNA 中克隆出了 6 条编码不同抗菌肽前体的 cDNA 序列, 分别命名为: preprotemporin-1CEa、preprotemporin-1CEb、preprotemporin-1CEc、preprobrevinin-1CEa、preprobrevinin-1CEb 和 preprochensinin-1。cDNA 碱基序列全长为 289~315 bp, 编码 59~65 个氨基酸。6 个抗菌肽前体由 3 部分结构域组成: 22 个氨基酸残基组成的信号肽、多个酸性氨基酸残基组成的中间序列、高度变异的成熟肽。preprotemporin-1CEa、preprotemporin-1CEb 和 preprotemporin-1CEc 属于 temporin-1 家族抗菌肽前体, 具有肽链短, C-端酰胺化的特点; preprobrevinin-1CEb 和 preprobrevinin-1CEa 属于 brevinin-1 家族抗菌肽前体, 在肽链的 C-端含有 RANA 盒结构, 可在 2 个半胱氨酸残基间形成二硫键, 组成 7 肽环; preprochensinin-1 在已知多种数据库中没有发现序列同源的多肽, 被鉴定为新抗菌肽。人工合成 temporin-1CEa、temporin-1CEb、brevinin-1CEa 和 chensinin-1 四种中国林蛙皮肤抗菌肽, 活性检测结果表明: 它们对金黄色葡萄球菌等 3 种革兰氏阳性细菌的生长具有明显抑制作用, 同时抑制乳腺癌 MCF-7 细胞和宫颈癌 HeLa 细胞生长。

**关键词:** 中国林蛙, cDNA 克隆, 序列分析, 抗菌活性, 抗癌活性

## Cloning of cDNAs encoding skin antimicrobial peptide precursors from Chinese brown frogs, *Rana chensinensis* and determination of antimicrobial, anticancer and haemolysis activity

Fenghui Yu, Lifang Zhang, Junfeng Li, Xiaofan Li, Xin Fu, and Dejing Shang

Liaoning Provincial Key Laboratory of Biotechnology and Drug Discovery, College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China

**Abstract:** Amphibian skin antimicrobial peptides exhibit a broad spectrum of antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacterium and cytotoxic activity responsible for inhibiting the growth of cancer cells. In this present study, six cDNAs encoding antimicrobial peptide precursors were cloned from the skin of Chinese brown frog, *Rana chensinensis* by RT-PCR and 3'-RACE procedure and identified as preprotemporin-1CEa, preprotemporin-1CEb, preprotemporin-1CEc, preprobrevinin-1CEa, preprobrevinin-1CEb, and preprochensinin-1, respectively. The nucleotide sequences of cDNA encoding 59~65 amino acid composed of

**Received:** July 12, 2008; **Accepted:** October 31, 2008

**Supported by:** the Science Research Grant from Liaoning Provinces Office of Education (No. 2006T85), the Science Grant from Dalian Science and Technology Bureau (No. 2007E21SF179).

**Corresponding author:** Dejing Shang. Tel: +86-411-84258575; E-mail: djshang@lnnu.edu.cn  
辽宁省创新团队项目(No. 2006T85)和大连市生物制药专项基金(No. 2007E21SF179)资助。

289–315 bp. Preprotemporin-1CEa, preprotemporin-1CEb and preprotemporin-1CEc are members of temporin family, which usually are short, hydrophobic, and C-terminally  $\alpha$ -amidated antimicrobial peptides. Preprobrevinin-1CEa and preprobrevinin-1CEb were identified as the members of the brevinin-1 family of antimicrobial peptides since both peptides contain “RANA box” that it's responsible for forming Cys-bridged cyclic heptapeptides at the C-terminal region of peptide. The nucleotide acid sequence and the deduced amino acid Sequence of preprochensinin-1 were not found to be identity with any known amphibian skin defensive peptides, so, preprochensinin-1 was identified as a novel peptide precursor. Four of bioactive peptides: temporin-1CEa, temporin-1CEb, brevinin-1CEa and chensinin-1 were synthesized to investigate their antimicrobial, anticancer and haemolysis activities. The results showed that all of the synthesized antimicrobial peptides in this study inhibited the growth of the Gram-positive bacterium, and exhibited the anticancer activity against the growth of MCF-7 cells and HeLa cells. Analysis of the *R. chensinensis* bioactive peptides and their gene expression will be beneficial for preservation of this species.

**Keywords:** *Rana chensinensis*, cDNA cloning, sequence analysis, antimicrobial activity, anticancer activity

近十年来, 抗生素药物的广泛使用导致很多细菌和病毒对现有的抗生素都产生了耐药性<sup>[1-3]</sup>, 耐药性病原株的扩散使得抗生素的疗效迅速下降甚至消失。因此, 寻找以全新的机制杀伤病原微生物, 且不易形成耐药性的新型抗生素已经成为目前研究的热点之一。

抗菌肽是生物体经诱导产生的一种具有广谱抗菌活性的小分子多肽, 一般由 20~60 个氨基酸组成, 分子量在 1~7 kD 左右, 具有热稳定、水溶性好、广谱抗菌等优点<sup>[4-7]</sup>, 对部分细菌、真菌、原虫、病毒及癌细胞等均具有强大的杀伤作用。这些基因编码的抗菌肽的作用机理不同于传统的抗生素, 它不是通过抑制细菌的代谢过程来杀死细菌, 而是直接在细菌细胞膜上穿孔, 使细胞内的活性物质泄漏导致细菌死亡<sup>[8,9]</sup>。因此, 抗菌肽不存在使用后产生耐药性的问题, 有望成为新一代的抗菌、抗病毒、抗癌药物。

两栖动物皮肤抗菌肽是其先天防御系统中的重要组成成分, 由基因编码, 核糖体合成, 10~50 个氨基酸残基组成, 分子表面带有正电荷, 大都可形成两亲的 $\alpha$ -螺旋结构。不同种属两栖动物的抗菌肽在分子量、氨基酸组成、带电性、疏水性、空间结构和抗菌谱等方面均各自不同。两栖动物皮肤抗菌肽大多都是碱性多肽, 容易与酸性的生物膜的层状排列的脂类双分子层相结合, 依靠两亲的 $\alpha$ -螺旋结构的特点形成跨膜的离子通道, 介导一系列的生物效应, 可以在不损伤正常细胞的前提下对细菌、真菌、病毒和癌细胞有抑杀作用<sup>[10-12]</sup>, 近年来成为国际上动物学、生理学、药理学研究的热点<sup>[13-15]</sup>, 作为新一代抗生素, 倍受人们关注。抗菌肽从发现到局部

使用已经经历了相当长的一段时间<sup>[16]</sup>, 但对它们的分子结构及遗传效应研究较少, 使得多数的抗菌肽无法应用于临床。

本研究根据 GenBank 中报道的蛙类皮肤抗菌肽前体的信号肽序列, 设计合成了 3'RACE 基因特异性引物, 利用 RT-PCR 和 RACE 技术, 首次对中国林蛙皮肤抗菌肽基因进行了克隆、序列分析及活性检测, 为两栖动物抗菌肽的开发和利用奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

中国林蛙(*Rana chensinensis*), 采集于辽宁省抚顺市新宾县。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 引物的设计

根据 GenBank 中蛙类皮肤抗菌肽基因前体信号肽 N-端的氨基酸序列, 设计并合成了 3'RACE 基因特异性引物 GSP1: 5'-ATGTTACCTTGAAGAAATCCCTG-3', 3'RACE Outer Primer: 5'-TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT-3', 3'RACE Inner Primer: 5'-CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG-3', 引物由日本 TaKaRa 大连公司合成。

#### 1.2.2 中国林蛙皮肤抗菌肽基因的 cDNA 克隆

从中国林蛙皮肤中提取总 RNA, 采用 TaKaRa 公司 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0 试剂盒合成 cDNA。以 cDNA 为模板, GSP1/3'RACE Outer Primer 为正反向引物, 进行第 1 次 PCR。以此产物为模板, GSP1/3'RACE Inner Primer 为正反向引物, 进行第 2 次 PCR。PCR 程序如下: 94°C 3 min, 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min, 共 30 个循环, 72°C 延长 10 min。PCR 产物经 3%琼脂糖凝胶电泳分离并回收目的片段, 回

收产物与 pMD19-T 载体连接, 热转化至感受态细胞 JM109 中, 37°C 过夜培养。挑选阳性菌落, 植菌, 取其中 14 个 cDNA 克隆分别使用 BcaBEST Primer RV-M 测序, 得到 6 个中国林蛙皮肤抗菌肽完整核苷酸序列。

### 1.2.3 中国林蛙皮肤抗菌肽基因的序列分析

将获得的 cDNA 序列经 <http://us.expasy.org/tools/> 翻译成相应的氨基酸序列, 并进行分子量、等电点、两亲性、跨膜位点等理化性质预测分析, 采用 NCBI 数据库中的 Blast 软件进行核苷酸和氨基酸序列同源性比较; 同时利用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP> 预测抗菌肽的信号肽, 以及利用 <http://us.expasy.org/tools/> 提供的软件工具和 anthewin 4.3 生物学软件进行氨基酸序列及功能分析。

### 1.2.4 中国林蛙皮肤抗菌肽的人工合成

按照标准 Fmoc 固相肽合成程序人工合成以下 4 个中国林蛙皮肤抗菌肽粗品: temporin-1CEa (FVD LKKIANIINSIFGK-NH<sub>2</sub>)、temporin-1CEb (ILPILSLIG GLLGK-NH<sub>2</sub>)、brevinin-1CEa (FLIGMTQGLICLITRK C) 和 chensinin-1 (SAVGRHGRRFGLRKRKH)。合成肽经反相 HPLC (Vydac218TP1022 柱 2.2 cm×25 cm) 纯化, 采用乙腈/水/三氟乙酸系统洗脱, MALDI-TOF 和 EPI 质谱分析。抗菌肽合成由北京赛百盛公司 (SBS Genetech Co., Ltd. Beijing, China) 完成。

### 1.2.5 抗菌活性的测定

按照 Conlon 等<sup>[17]</sup>的方法, 在 96 孔板中分别加入 6 种不同浓度 (1.0~100 mmol/L) 的抗菌肽溶液 50 μL, 再在各孔中分别加入处于生长对数期的 4 种细菌 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus agalactiae* 菌液各 50 μL, 最终菌量为每孔 5×10<sup>5</sup> CFU/mL。最后在每孔中加入 10 μL 0.5% TTC 溶液, 振荡 1 min 使其混匀, 加盖后放入 37°C 温箱中孵育 24 h, 观察颜色变化, 读取各最低抑菌浓度值 (MICs)。有菌生长则孔内呈红色, 无菌生长则孔内无颜色变化。MICs 定义为无菌生长的抗菌肽的最低浓度。液体培养基作为阴性对照, 庆大霉素作为阳性对照。

### 1.2.6 抗癌活性的测定

采用 MTT 比色法<sup>[18]</sup>, 在 96 孔板中分别加入处于对数生长期的 MCF-7 和 HeLa 细胞悬液 200 μL, 37°C 培养 24 h 后加入 4 μL 5 种不同浓度 (1.0~

200 μmol/L) 的抗菌肽溶液, 继续培养 20、44、68 h 后加入 20 μL 5 mg/mL 的 MTT 溶液, 孵育 4 h 终止培养, 弃去上清, 加 150 μL DMSO 振荡 10 min。用免疫酶标仪 (波长 570 nm) 测定各孔的吸光值, 计算半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 值。IC<sub>50</sub> 定义为: 肿瘤细胞半致死率的抗菌肽浓度。培养液组作为阴性对照, 丝裂霉素组作为阳性对照。

### 1.2.7 抗菌肽溶血性的测定

将小鼠红细胞用 0.9% 氯化钠溶液配成 2% 的混悬液<sup>[19]</sup>, 取 1 mL 红细胞混悬液分别加入 7 种不同浓度的抗菌肽溶液 (终浓度为 1.0~500 μmol/L), 轻混后置 37°C 的恒温箱中温育。3 h 后离心, 取上清, 测 545 nm 吸光值, 计算溶血率和 LD<sub>50</sub> 值。溶血率 (%) = (试验管吸光度 - 阴性对照管吸光度) / (阳性对照管吸光度 - 阴性对照管吸光度) × 100%。0.9% 生理盐水作为阴性对照, 蒸馏水作为阳性对照。LD<sub>50</sub> 值为溶血率达 50% 时的抗菌肽溶液的浓度。

## 2 结果

### 2.1 中国林蛙皮肤抗菌肽基因 PCR 扩增结果

中国林蛙皮肤抗菌肽基因的 RT-PCR 和 3'RACE 结果得到大小约 300 bp 的 cDNA (图 1)。

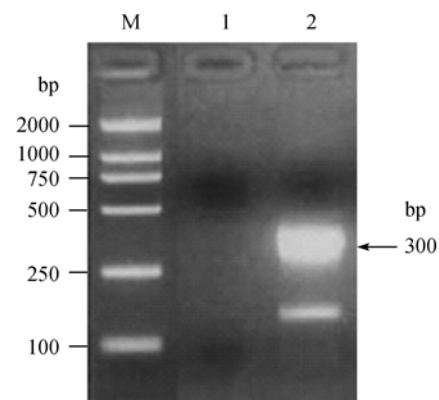


图 1 中国林蛙皮肤抗菌肽基因的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel (3.0%) electrophoresis showing the products of the RT-PCR and 3'RACE. M: DL 2000 DNA marker; 1: product of outer PCR; 2: product of 3'RACE.

### 2.2 中国林蛙皮肤抗菌肽基因的 cDNA 全长及序列分析

经 RT-PCR 及 RACE 后, 得到 6 条编码中国林蛙皮肤抗菌肽前体的 cDNA 序列, 其核苷酸序列及推导出的氨基酸序列见图 2 和图 3。

采用 NCBI 数据库中的 Blast 软件, 将得到的 6 个中国林蛙皮肤抗菌肽前体基因与其他蛙类抗菌肽基因的氨基酸序列进行同源性比较。结果表明: 克隆 1 与 *Rana sakuraii* 的 preprotemporin-1SKc、*Rana ornativentris* 的 preprotemporin-1Oc1 和 *Rana tagoi* 的 temporin-1TGb 前体基因的氨基酸序列同源性分别为 86%、78%和 83%; 克隆 2 与 *Rana amurensis* 的 amurin-3 前体基因的氨基酸序列完全相同; 克隆 3 与 *Rana chensinensis* 的 chensirin-2 前体同源性为 98%, 都属于 temporin-1 家族抗菌肽前体; 克隆 4 和克隆 5 与 *Odorrana grahami* 的 brevinin-1E-OG2 同源性分别为 75%和 74%, 与 *Rana esculenta* 的

brevinin-1E 同源性分别为 74%和 70%, 属于 brevinin-1 家族抗菌肽前体。因此, 将以上 5 个中国林蛙皮肤抗菌肽前体基因依次命名为: preprotemporin-1CEa、preprotemporin-1CEb、preprotemporin-1CEc、preprobrevinin-1CEa 和 preprobrevinin-1CEb; 克隆 6 在已知多种数据库中没有发现序列高度同源的多肽, 为新抗菌肽, 命名为 preprochensinin-1, 其成熟肽 (SAVGRHGRRFGLRKHRKH)18 个氨基酸残基中含有 10 个碱性氨基酸残基, 净电荷为+10, 是强阳离子抗菌肽, 同时含有 3 个组氨酸, 与人类和灵长类动物唾液腺分泌的富含组氨酸的 P113D 抗菌肽有 30%的相似性。

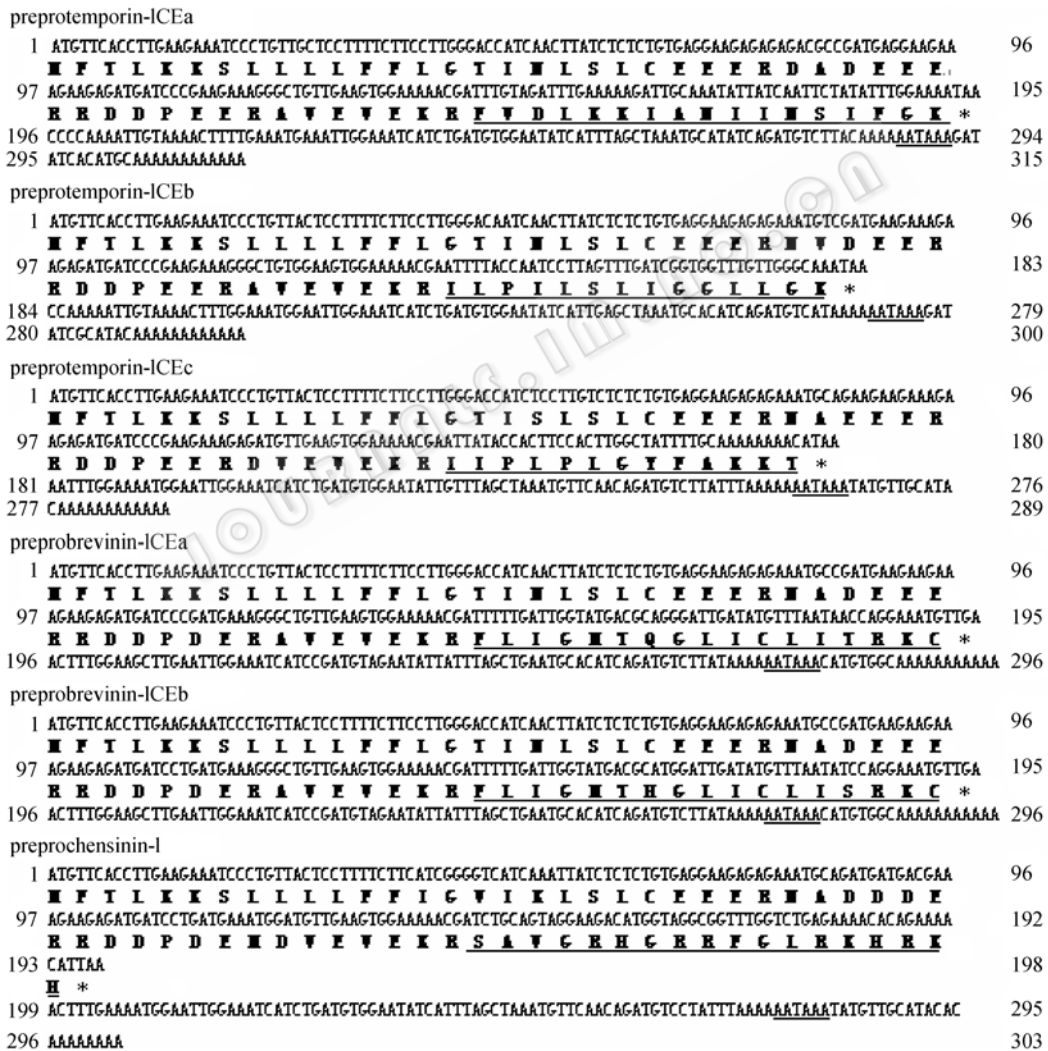


图 2 六条中国林蛙皮肤抗菌肽前体的核苷酸序列及推导出的氨基酸序列  
 Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of six antimicrobial peptide precursors from the skin of Chinese brown frog, *Rana chensinensis*. In the nucleotide sequences, the polyadenylation signal is double underlined and "\*" indicates the stop codon(TAA/TGA). The nucleotide is numbered on the both sides. The deduced amino acid sequence is shown in capital letters under the nucleotide sequence and the mature peptide is underlined.

```
preprotemporin-1CEa  MFTLKKSLLLLFFLGTINLSLCE EERNDADEEERRDDPEERAUEVE KR FUDLKKIANIINSIFGK- 64
preprotemporin-1CEb  MFTLKKSLLLLFFLGTINLSLCE EEERNUDEE-RRDDPEERAUEVE KR ILP---ILSLIGGLLKG- 60
preprotemporin-1CEc  MFTLKKSLLLLFFLGTISLSLCE EEERNAEEEE-RRDDPEERDUEVE KR IIPLP-----LGVFAKKT 59
preprobrevinin-1CEa  MFTLKKSLLLLFFLGTINLSLCE EEERNADEEERRDDPDERAUEVE KR FLIGM-TQGLICLITRKC 64
preprobrevinin-1CEb  MFTLKKSLLLLFFLGTINLSLCE EEERNADEEERRDDPDERAUEVE KR FLIGM-THGLICLISRKC 64
preprochensinin-1    MFTLKKSLLLLFFIGVIKLSLCE EEERNADDDERRDDPEMDUEVE KR SAUGRHGRRFGLRKRKH 65
*****:*_*.**** *****:..:: *****:* **** ** *
                A                B                C
```

图 3 六条中国林蛙皮肤抗菌肽前体的氨基酸序列比对

Fig. 3 The alignment of amino acid sequences of six antimicrobial peptide precursors from the skin of Chinese brown frog, *Rana chensinensis*. Conserved residues are indicated with asterisks. "KR": indicates dibasic residues processing site for the releasing of the mature peptide in the C-terminus. A: putative signal peptide; B: acidic intervening regions; C: hypervariable mature peptide.

上述 6 条编码中国林蛙皮肤抗菌肽前体的 cDNA 序列全长(包括开放阅读框 ORF 和 3'UTR 区)依次为: 315 bp、300 bp、289 bp、296 bp、296 bp、303 bp, 编码 59~64 个氨基酸。这些抗菌肽前体均含有 3 个结构域: 22 个氨基酸残基组成的信号肽、多个酸性氨基酸残基组成的中间序列、高度变异的成熟肽。其中 6 条多肽的信号肽部分除 preprochensinin-1 中 Leu<sup>14</sup> 和 Gly<sup>16</sup> 分别替换为 Ile<sup>14</sup> 和 Val<sup>16</sup> 之外, 其余氨基酸序列相同, 且与其他两栖动物皮肤抗菌肽中的信号肽区域是高度保守的。信号肽的断裂位点是 Cys<sup>22</sup>。6 条多肽的中间序列也表现出了高度的序列相似性。在酸性的中间序列与成熟肽之间是一个典型 Lys-Arg(KR)二元残基酶切割位点, 释放 C 端的成熟肽。6 个克隆的中国林蛙皮肤抗菌肽前体已被收录在 GenBank 核苷酸序列数据库中, 其登录号分别为: preprotemporin-1CEa: EU624139; preprotemporin-1CEb: EU746505; preprotemporin-1CEc: EU746504; preprobrevinin-1CEa: EU746501; preprobrevinin-1CEb: EU746502; preprochensinin-1: EU746503。

### 2.3 中国林蛙皮肤抗菌肽的理化性质及功能预测

根据 <http://us.expasy.org/tools/>和 anthewin4.3 生物学软件分析, 6 个抗菌肽(成熟肽)分子量(MW)在 1406~2155 之间, 理论等电点(pI)在 8.75~12.60 之间, 6 个抗菌肽都呈阳离子性。从预测的成熟肽二级结构可以看出: temporin-1CEa、temporin-1CEb 和 temporin-1CEc 肽链短, C-端形成酰胺化, 其中 temporin-1CEa 和 temporin-1CEb 从第 4 个氨基酸开始到第 15 或第 10 个氨基酸之间形成  $\alpha$ -螺旋结构, 而 temporin-1CEc 从 1 到 13 个氨基酸之间形成无规卷曲; Brevinin-1CEa 和 brevinin-1CEb 成熟肽部分都含有 17 氨基酸, 在肽链的 C-端含有 RANA 盒结构, 可在 2 个半胱氨酸残基间形成二硫键, 形成 7 肽

环形肽, brevinin-1CEa 的 2~5 个和 10~14 个氨基酸形成延伸链, brevinin-1CEb 的 9~14 个氨基酸形成  $\alpha$ -螺旋结构。新抗菌肽 chensinin-1 从 4~9 和 12~14 个氨基酸形成  $\alpha$ -螺旋结构。3 个 temporin-1 家族抗菌肽和 chensinin-1 都可以形成两亲性的  $\alpha$ -螺旋结构, 即肽链中的亲水氨基酸和疏水氨基酸, 分别沿  $\alpha$ -螺旋轴平行的 2 个侧面, 一侧亲水残基集中, 显亲水性, 另一侧疏水残基较多, 显疏水性。两亲性使得螺旋的侧面上形成了疏水矩, 并与  $\alpha$ -螺旋在 N 端和 C 端形成的电荷偶极一起, 对抗菌肽活性起关键作用。根据以往对抗菌肽抗菌机制的研究, 可推测这 4 个抗菌肽可以通过两亲性的  $\alpha$ -螺旋结构中的正电荷与细菌细胞膜表面的负电荷相互吸引并结合, 然后通过疏水氨基酸形成跨膜离子通道, 引起细菌细胞内内容物流失, 造成细菌死亡<sup>[20]</sup>。

### 2.4 中国林蛙皮肤抗菌肽的抗菌、抗癌和溶血活性测定

由表 1 可知: brevinin-1CEa 对革兰氏阳性和阴性细菌均有抑制作用, 具有广谱抗菌活性, 其中对金黄色葡萄球菌的抑制作用较强, MIC 值为 12.8  $\mu\text{mol/L}$ ; temporin-1CEa、temporin-1CEb 和 chensinin-1 均只对革兰氏阳性菌有抑制作用, temporin-1CEa 对金黄色葡萄球菌、蜡状芽孢杆菌和乳链球菌抑制作用较强, MIC 值均为 13.1  $\mu\text{mol/L}$ ; chensinin-1 对蜡状芽孢杆菌和乳链球菌的 MIC 值均为 11.6  $\mu\text{mol/L}$ , 要明显强于对金黄色葡萄球菌的抑制作用, 三者对大肠杆菌的 MIC 值均大于 100  $\mu\text{mol/L}$ , 即在测试浓度范围内无明显的抑菌效果。

由表 2 可知: brevinin-1CEa、temporin-1CEa 和 temporin-1CEb 对 MCF-7 和 HeLa 细胞均有不同程度的抑制作用。在 LD<sub>50</sub> 值范围内, temporin-1CEa 对 2 种癌细胞均有明显的抑制作用, 作用 MCF-7 细胞的 IC<sub>50</sub> 值仅为 8  $\mu\text{mol/L}$ , 抑制作用远强于 HeLa 细胞;

表 1 人工合成的中国林蛙皮肤抗菌肽的最小抑菌浓度

Table 1 Minimum inhibitory concentrations (MICs) of synthetic peptides from the skin of *Rana chensinensis* against reference microorganisms

Microorganisms	MIC ( $\mu\text{mol/L}$ )			
	Brevinin-1CEa	Temporin-1CEa	Temporin-1CEb	Chensinin-1
<i>Staphylococcus aureus</i>	12.8	13.1	31.2	58.0
<i>Bacillus cereus</i>	25.6	13.1	46.8	11.6
<i>Streptococcus lactis</i>	25.6	13.1	46.8	11.6
<i>Escherichia coli</i>	25.6	>100	>100	>100

表 2 人工合成的中国林蛙皮肤抗菌肽的抗癌活性及溶血活性

Table 2 Inhibition concentrations ( $\text{IC}_{50}$ ) of synthetic peptides from the skin of *Rana chensinensis* against two cancer cells and haemolysis  $\text{LD}_{50}$  ( $\mu\text{mol/L}$ )

Cell lines	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )			
	Brevinin-1CEa	Temporin-1CEa	Temporin-1CEb	Chensinin-1
MCF-7	54	8	64	>200
HeLa cells	42	40	128	>200
$\text{LD}_{50}$	48	160	98	>500

brevinin-1CEa 仅对 HeLa 细胞有抑制作用,  $\text{IC}_{50}$  值接近  $\text{LD}_{50}$  值; temporin-1CEb 仅对 MCF-7 细胞有抑制作用; chensinin-1 则对 MCF-7 和 HeLa 细胞均无抑制作用, 但其  $\text{LD}_{50}$  值大于 500  $\mu\text{mol/L}$ , 即不会对哺乳动物的红细胞产生溶血作用。

### 3 讨论

本研究通过 RT-PCR 和 3'RACE 技术克隆了 6 条中国林蛙皮肤抗菌肽前体的全长 cDNA, 并推导出编码的氨基酸序列, 与其他两栖动物皮肤抗菌肽基因进行了核苷酸和氨基酸序列同源性比较分析。结果显示: preprotemporin-1CEa、preprotemporin-1CEb 和 preprotemporin-1CEc 的氨基酸序列与 temporin-1 家族抗菌肽前体基因高度同源; preprobrevinin-1CEa 和 preprobrevinin-1CEb 与 brevinin-1 家族高度同源; 而 preprochensinin-1 在已知多种数据库中没有发现序列同源的多肽, 被鉴定为新抗菌肽。

目前为止, 大量抗菌肽的结构-活性分析研究表明, 抗菌肽具有抗菌活性所必备的 2 个条件是: 1) 阳离子电荷; 2) 可诱导的两性分子结构<sup>[21-24]</sup>。抗菌肽的抗菌作用是通过本身所带的正电荷与细菌表面的负电荷的吸引相互接触, 然后通过疏水氨基酸形成跨膜离子通道, 引起细胞内容物流失, 从而造成细胞死亡。根据 ExPASy 网站和 anthewin4.3 生物学软件的二级结构预测可知, 从中国林蛙皮肤中克隆

的 6 种抗菌肽前体的成熟肽都属于阳离子抗菌肽, 含有碱性氨基酸及部分疏水性氨基酸。两性亲性使得螺旋的侧面上形成了疏水矩, 并与  $\alpha$ -螺旋在 N 端和 C 端形成的电荷偶极一起, 对抗菌肽活性起关键作用, 具有广谱抗菌活性。

基于以上的分析结果, 我们选择 temporin-1CEa、temporin-1CEb、brevinin-1CEa 和 chensinin-1 四种抗菌肽进行了人工合成, 采用 96 孔板法和 MTT 比色法进行了抗菌、抗癌实验以及溶血试验研究。实验结果表明 4 种抗菌肽中, temporin-1CEa 对 3 种革兰氏阳性细菌的抗菌活性好, 抗癌活性最高,  $\text{IC}_{50}$  值远远低于哺乳动物红细胞发生溶血作用时的药物浓度, 这说明在不破坏哺乳动物细胞完整性的情况下, 它可以抑制部分革兰氏阳性菌的生长, 并能有效的抑制乳腺癌和宫颈癌细胞生长, 显示出作为新型抗生素和抗肿瘤药物的应用前景。brevinin-1CEa 对革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌均有抑制作用, 并有抗肿瘤活性, 但溶血浓度较低,  $\text{IC}_{50}$  值接近于  $\text{LD}_{50}$  值, 只有进行相应的结构改变, 使其溶血活性下降或消失后才有进一步应用的可能。chensinin-1 是一种新的蛙类皮肤抗菌肽, 可以明显抑制革兰氏阳性菌的生长, 但无抗癌和溶血作用。temporin-1CEb 与 temporin-1CEa 虽然同属 temporin-1 家族抗菌肽, 但前者的抗菌、抗癌及溶血活性要明显差于后者。本研究显示: 在活性上, 4 种抗菌肽相互之间存在较大

差异, 尤其是同一家族的 temporin-1CEa 与 temporin-1CEb 之间, 推测是与抗菌肽的二级结构有关。抗菌肽的抑菌活性与其形成 $\alpha$ -螺旋的数量有关<sup>[25-27]</sup>, 而溶血作用与疏水残基含量有关, 肽分子中疏水残基含量越高则往往溶血作用也越强<sup>[28-30]</sup>。二级结构预测分析表明: temporin-1CEa 肽链中含有 9 个疏水氨基酸残基聚集在一起, 形成疏水性基团, 分布在螺旋轴平行的 1 个侧面, 而另 7 个碱性氨基酸残基聚集在螺旋轴的另外一侧, 显亲水性, 从而形成明显的两亲性二级结构,  $\alpha$ -螺旋结构含量为 70.59%, 明显高于 temporin-1CEb, 因此 temporin-1CEa 的抗菌和抗癌活性明显强于 temporin-1CEb。另外, temporin-1CEb 疏水性氨基酸残基要多于 temporin-1CEa, 溶血作用强, 也限制了其作为抗生素在医药中的应用, 希望本研究为两栖类抗菌肽的开发和利用提供了参考。

**致谢** 本研究得到日本宝生物大连公司郑俊杰和袁晓东的大力支持, 特此感谢!

## REFERENCES

- [1] Zhou JW, McClean S, Thompson A, *et al.* Purification and characterization of novel antimicrobial peptides from the skin secretion of *Hylarana guentheri*. *Peptides*, 2006, **27**: 3077-3084.
- [2] Mäntylä T, Sirola H, Kansanen E, *et al.* Effect of temporin a modifications on its cytotoxicity and antimicrobial activity. *APMIS*, 2005, **113**: 497-498.
- [3] Zhou M, Liu Y, Chen TB, *et al.* Components of the peptidome and transcriptome persist in lin wa pi: The dried skin of the Heilongjiang brown frog (*Rana amurensis*) as used in traditional Chinese medicine. *Peptides*, 2006, **27**: 2688-2694.
- [4] Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature*, 2005, **3**: 238-240.
- [5] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 2002, **415**: 389-394.
- [6] Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev*, 2003, **55**: 27-33.
- [7] Bu GH, Li HJ, Yang GY, *et al.* The property and application of antibacterial peptides. *Prog Vet Med*, 2005, **26**(3): 26-28.  
布冠好, 李宏基, 杨国宇, 等. 抗菌肽的作用特点及应用前景. *动物医学进展*, 2005, **26**(3): 26-28.
- [8] Maloy WL, Kzri UP. Structure activity studies on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers*, 1995, **37**(2): 105-122.
- [9] Francis MJ. Peptides vaccines for viral diseases. *Sci Prog*, 1990, **74**(293): 115-130.
- [10] Michael Z. 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**(15): 5449-5453.
- [11] Rozek T, Wegener KL, Bowie JH, *et al.* The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian Bell Frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis*. *Eur J Biochem*, 2000, **267**: 5330-5331.
- [12] Vanhoye D, Bruston F, Nicolas P, *et al.* Antimicrobial peptides from hylid and ranin frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain. *Eur J Biochem*, 2003, **270**: 2068-2081.
- [13] Daher KA, Selsted ME, Lehrer RI. Direct inactivation of virus by human granulocyte defensins. *J Virol*, 1986, **12**: 1068-1074.
- [14] Lehrer RI, Daher K, Ganz T, *et al.* Direct inactivation of viruses by mcp-1 and mcp-2, natural peptide antibiotics from rabbit leukocytes. *J Virol*, 1985, **54**: 467-472.
- [15] Matanic VC, Castilla V. Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus and herpes simplex virus. *Int J Antimicro Ag*, 2004, **23**: 382-389.
- [16] Boman HG. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol*, 1995, **13**: 61-92.
- [17] Conlon JM, Al-Ghaferi N, Abraham B, *et al.* Purification and properties of laticceptin, an antimicrobial peptide from skin secretions of the South American frog *Leptodactylus laticeps*. *Protein Pept Lett*, 2006, **13**(4): 411-415.
- [18] Sargent JM. The use of MTT assay to study drug resistance in fresh tmnour samples. *Recent Results Cancer Res*, 2003, **161**: 13.
- [19] Fei JJ, Zhou L, Cui Y, *et al.* The hemolytic research of two Tween-80. *Heilongjiang Med Pharm*, 2001, **24**(4): 40.  
费建军, 周丽, 崔友, 等. 两种吐温-80 的溶血性试验观察. *黑龙江医药学*, 2001, **24**(4): 40.
- [20] Zhang LJ, Rozek A, Robert EW, *et al.* Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 35714-35722.
- [21] Xu ND, Zhong L, Zhang W, *et al.* The relationship between structure and antibacterial activity of cationic antimicrobial peptides. *Chin J Public Health*, 2005, **21**(9): 1143.  
许若丹, 钟理, 张伟, 等. 阳离子抗菌肽结构与抗菌活性的关系. *中国公共卫生*, 2005, **21**(9): 1143.
- [22] Raj PA, Antonyraj KJ, Karunakaran T. Large-scale synthesis and functional elements for the antimicrobial activity of defensins. *Biochem J*, 2000, **347**(3): 633.
- [23] Wen JC, Qin YZ, Song AG. Research advances in cationic antimicrobial peptides. *World Notes Antibiot*, 2002, **23**(6): 267-269.  
文加才, 秦永忠, 宋爱刚. 阳离子抗菌肽的研究进展.

- 国外医药抗生素分册, 2002, **23**(6): 267-269.
- [24] Kini MR, Evans HJ. A common cytolytic region in myotoxins. Hemolysins. Cardio toxins and antibacterion peptides. *J Peptide Res*, 1989, **34**: 277.
- [25] Wang YZ, Wang ZQ, Xu ZR. Comparison of antimicrobial activity in vitro of antimicrobial peptides and antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Chin J Vet Sci*, 2004, **24**(3): 272.  
汪以真, 王中强, 许梓荣. 抗菌肽与抗生素的体外抗菌效果比较. *中国兽医学报*, 2004, **24**(3): 272.
- [26] Maloy WL, Kari UP. Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers*, 1995, **37**: 105-122.
- [27] Lu QN, Luo XM, Jiang H, *et al.* Progress in investigation of antimicrobial peptides. *Jiangxi Sci*, 2007, **25**(4): 430.  
卢其能, 罗晓明, 江辉, 等. 抗菌肽的研究进展. *江西科学*, 2007, **25**(4): 430.
- [28] Mor A, Amiche M, Nicolas P. Structure, synthesis, and activity of dermaseptin b, a novel vertebrate defensive peptide from frog skin: relationship with adenoregulin. *Biochemistry*, 1994, **33**(21): 6642-6650.
- [29] Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of precursor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**: 5449-5453.
- [30] Han JY, Qiao HW, Zhao RL, *et al.* Cloning and expression of antimicrobial peptides gene from bullfrog skin. *Chin J Vet Sci*, 2007, **27**(3): 401-402.  
韩俊友, 乔红伟, 赵瑞利, 等. 牛蛙蛙皮抗菌肽基因的克隆、测序及其表达. *中国兽医学报*, 2007, **27**(3): 401-402.



## 工业生物技术创新与发展——第三届中国工业生物技术发展高峰论坛

### 《生物工程学报》专刊征文通知

工业生物技术是我国社会经济可持续发展的重要支撑, 在当前能源资源短缺、粮食危机、生态环境恶化等日益严峻的形势下, 必须大力发展工业生物技术, 利用可再生资源, 发展以生物催化和生物转化为核心的工业生物技术, 生产能源、材料和化学品, 从而解决粮食、环境污染等问题, 构建可持续发展的和谐社会。

继 2007 年首届和 2008 年第二届中国工业生物技术发展高峰论坛在天津滨海新区取得圆满成功之后, 2009 年 4 月 23~25 日, 第三届中国工业生物技术发展高峰论坛将在天津举行。此次论坛从主题、筹办理念、邀请嘉宾、组织形式等各个方面都有了全新的突破。除了大会报告以外, 论坛将以战略篇、学术篇和国际篇等三大版块进行组织。

为传播会议成果, 促进我国工业生物技术领域的交流和发展, 《生物工程学报》将特辟专刊, 于会后推出“工业生物技术创新与发展”——第三届中国工业生物技术发展高峰论坛专刊。本专刊将集中反映有关生物能源、发酵生物产品、生物基化学品、生物炼制等的最新研究成果, 促进有关创新研究。现特向国内外相关领域的专家学者和研发人员公开征集稿件, 由专家遴选后的优秀论文将邀请为会议报告或通过《生物工程学报》正式出版。

**专刊主题:** 工业生物技术创新与发展

**一、征文范围:** 本专刊收录如下研究方向的论文, 但不限于此:

1、工业酶与现代酶工程; 2、工业生物催化; 3、先进生物加工与绿色化学; 4、代谢工程与合成生物学; 5、系统生物技术; 6、新一代工业发酵与生物炼制; 7、生物能源与生物燃料; 8、生物材料和生物基化学品; 9、生物过程工程和生物系统工程

**二、投稿要求**

1. 投稿方式: 通过《生物工程学报》投稿系统在线投稿, 详见主页(<http://journal.im.ac.cn/cjbcn/>)投稿须知/投稿方式。

注意事项: 投稿时, 请在邮件主题栏注明“工业生物技术专刊投稿”字样。

2. 稿件格式: 参照《生物工程学报》论文格式, 详见主页/下载专区/生物工程学报写作及体例要求.pdf 和生物工程学报中文模板.doc。

3. 投稿文章应未在正式出版物上发表过, 也不在其他刊物或会议的审稿过程中, 不存在一稿多投现象; 应保证投稿文章的合法性(无抄袭、剽窃、侵权等不良行为)。

4. 其他投稿须知请参阅《生物工程学报》的主页。本主题相关已发表论文请参见《生物工程学报》2008 年 24 卷 6 期, “中国工业生物技术发展高峰论坛 2008 专刊”。全文请阅读网上 [http://journals.im.ac.cn/cjbcn/ch/reader/advance\\_query.aspx](http://journals.im.ac.cn/cjbcn/ch/reader/advance_query.aspx)。

5. 专刊投稿文章不收审稿费; 录用后正式刊发的文章将请作者提交版权转让承诺书, 并按照《生物工程学报》相关规定收取版面费和支付作者稿酬, 同时赠送样刊及单行本。

6. 有关本次会议的详情, 请浏览 <http://forum.bioindustry.cn/>。

**三、截稿日期:** 2009 年 3 月 15 日。