

人ⅡA型磷脂酶A₂衍生多肽M17杀菌作用的研究

淳于柳爽，梁宁生*
(广西医科大学附属肿瘤医院 药学部，南宁 530021)

[摘要] 目的:研究和比较人ⅡA型磷脂酶A₂(phospholipase A₂,PLA₂)衍生多肽M17,P26和N₁₋₁₁对不同细菌在体外的杀菌效应。方法:根据人ⅡA型PLA₂氨基酸顺序分别设计合成3个肽分子M17(P₅₁₋₆₇),P26(P₉₉₋₁₂₄),N₁₋₁₁(P₁₋₁₁)。采用琼脂铺板计数法测定杀菌活性,将不同浓度衍生肽分别与革兰阳性菌(G⁺)金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、屎肠球菌和革兰阴性菌(G⁻)大肠杆菌、绿脓杆菌、鲍曼不动杆菌在37℃孵育2.5h,然后铺板并置于37℃恒温箱培养18~24h,记录每一琼脂板上的菌落数(CFU),并计算多肽作用后的杀菌率。结果:ⅡA型PLA₂M17对枯草杆菌、金黄色葡萄球菌、屎肠球菌的杀菌回归方程分别为: $Y=1.464X+3.795$ (ED₅₀ 6.65 mg·L⁻¹), $Y=1.152X+3.419$ (ED₅₀ 23.57 mg·L⁻¹), $Y=0.836X+3.832$ (ED₅₀ 24.95 mg·L⁻¹);对大肠杆菌、鲍曼不动杆菌、绿脓杆菌的杀菌回归方程分别为: $Y=0.877X+4.054$ (ED₅₀ 12.00 mg·L⁻¹), $Y=1.094X+3.371$ (ED₅₀ 30.83 mg·L⁻¹), $Y=1.027X+3.626$ (ED₅₀ 21.77 mg·L⁻¹);M17肽分子对G⁺菌与G⁻菌均有较强的杀菌活性。P26和N₁₋₁₁对金黄色葡萄球菌的杀菌回归方程分别为: $Y=0.915X+2.766$ (ED₅₀ 276.39 mg·L⁻¹), $Y=1.389X+1.668$ (ED₅₀ 250.52 mg·L⁻¹),P26和N₁₋₁₁对大肠杆菌的杀菌回归方程为: $Y=1.327X+1.437$ (ED₅₀ 484.18 mg·L⁻¹), $Y=0.881X+2.903$ (ED₅₀ 240.02 mg·L⁻¹);N₁₋₁₁和P26对G⁺菌有较强的杀菌活性,但对G⁻菌杀菌活性较弱。M17肽分子对金黄色葡萄球菌的杀菌活性强于P26及N₁₋₁₁,M17肽分子对大肠杆菌的杀菌活性明显强于P26及N₁₋₁₁。结论:衍生自人ⅡA型PLA₂保守区域17个氨基酸残基的肽M17对G⁺菌和G⁻菌均有较强的杀菌活性,这可能与M17肽分子更易于与细菌结合并发挥作用有关。

[关键词] 人ⅡA型磷脂酶A₂;保守区域;抗菌肽;衍生肽

[中图分类号] R [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)20-0216-04

[doi] 10.11653/syjf2013200216

Study on Bactericidal Activity of the Polypeptide M17 Derived from Human Group Ⅱ A Phospholipase A₂

CHUN YU Liu-shuang, LIANG Ning-sheng*
(Department of Pharmacy, Affiliated Tumor Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] Objective: To study and compare the bactericidal activity of the polypeptide M17, P26 and N₁₋₁₁ which derives from hunman group Ⅱ A phospholipase A₂ (PLA₂, phospholipase A₂) *in vitro*. Method: Peptide M 17 (P₅₁₋₆₇), P26 (P₉₉₋₁₂₄), N₁₋₁₁ (P₁₋₁₁) were synthesized according to the sequence of human Group Ⅱ A PLA₂ amino acid. Six species of bacterial, Gram positive (G⁺) *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, Gram negative (G⁻) *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus pyocyaneus*, were incubated with different concentration of polypeptides at 37℃ for 2.5 hours in a water bath respectively. Then the reaction solution was diluted and agar plates were poured. After 18-24 hours incubation in the thermostated container at 37℃. The colony formed units were counted and the bactericidal rates were calculated. Result: Regression equation of PLA₂M17 bactericidal activity on the G⁺ bacteria (*lococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*) were $Y=1.464X+3.795$ (ED₅₀ 6.65 mg·L⁻¹), $Y=1.152X+3.419$ (ED₅₀ 23.57 mg·L⁻¹), $Y=0.836X+3.832$ (ED₅₀ 24.95 mg·L⁻¹). Regression equation of M17 bactericidal activity on the G⁻

[收稿日期] 20130329(009)
[基金项目] 广西医药卫生重点科研课题(重2011075);广西自然科学基金项目(2010GXNSFA013246)
[通讯作者] *梁宁生,E-mail:liangn01@163.com

bacteria (*E. coli*, *A. baumannii*, *B. pyocyaneus*) were $Y = 0.877X + 4.054$ (ED_{50} 12.00 mg·L⁻¹), $Y = 1.094X + 3.371$ (ED_{50} 30.83 mg·L⁻¹), $Y = 1.027X + 3.626$ (ED_{50} 21.77 mg·L⁻¹). PLA₂M17 possessed potent bactericidal activity on the G⁺ bacteria and G⁻ bacteria. Regression equation of N₁₋₁₁ and P26 bactericidal activity on *B. subtilis* were $Y = 0.915X + 2.766$ (ED_{50} 276.39 mg·L⁻¹), $Y = 1.389X + 1.668$ (ED_{50} 250.52 mg·L⁻¹). Regression equation of N₁₋₁₁ and P26 bactericidal activity on *E. coli* were $Y = 1.327X + 1.437$ (ED_{50} 484.18 mg·L⁻¹), $Y = 0.881X + 2.903$ (ED_{50} 240.02 mg·L⁻¹). N₁₋₁₁ and P26 possessed strong bactericidal activity of G⁺ bacteria, but weaker activity of G⁻ bacteria. M17 possessed stronger bactericidal activity than N₁₋₁₁ and P26 on *B. subtilis* and *E. coli*. **Conclusion:** Peptide M17 derived from human Ⅱ type A PLA₂ highly conserve region possesses a strong bactericidal activity, this may be related to the M17 peptide molecules more easily binding to bacteria.

[**Key words**] human group Ⅱ A phospholipase A₂; conserved region; antibacterial peptid; derived peptide

抗菌肽是一大类具有杀菌活性的肽类,由于这些肽类来源不同,结构各异,抗菌谱和活性也不一样,故一直是抗菌研究的一个重要方面^[1]。抗菌肽在自然界广泛存在,即存在于高等生物如各哺乳类生物,也存在于低等生物如昆虫,一些植物也存在有抗菌肽。近些年来,对天然抗菌蛋白衍生出的多肽进行研究是抗菌研究的一个新热点,一些研究获得了很大的成功,如来自乳铁蛋白的衍生肽,已经进入了临床研究阶段^[2]。人ⅡA型磷脂酶A₂(phospholipase A₂, PLA₂),也称为血小板型ⅡA型PLA₂,是一种重要的抗菌蛋白,在宿主防御细菌感染方面发挥着重要的作用^[3]。笔者尝试着对ⅡA型磷脂酶A₂分子衍生出的多肽进行分析和研究,寻找出具有抗菌作用的肽分子,并对它们的抗菌特点和结构进行分析,为开发抗菌肽类抗菌药物提供一些依据。

1 材料

1.1 试剂 Hepes和小牛血清白蛋白均为北京Solarbio公司产品;LB培养基粉(批号1009533):生物工程(上海)有限公司提供;LB营养琼脂(批号100127):购自北京路桥技术责任有限公司;无水CaCl₂(批号20081106):成都科隆化工试剂厂生产;RPMI-1640(批号970810)为Gibco BRL公司产品。

1.2 细菌 3种革兰阳性菌(G⁺菌):金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC26003)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*, ATCC63501)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*, ATCC32088);3种革兰阴性菌(G⁻菌):大肠杆菌(*Escherichia coli*, ATCC44113)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、绿脓杆菌(*Bacillus pyocyaneus*, ATCC10104)。以上标准菌株

均由广西医科大学微生物学教研室提供(购自中国食品药品检定研究院)。

1.3 仪器和设备 Anke TGL-16C台式离心机(上海安亭科学仪器厂);TU-1810S紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);Thermo 420型恒温气浴摇床(Thermo Electron公司);HWS-20恒温水箱(江苏太仓市实验设备厂);J3-NAPCO-5410型培养箱[克勒格瓦尼(上海)分析仪器有限公司]。

2 方法

2.1 多肽的制备 从美国国家生物工程信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)网站获取人ⅡA型磷脂酶A₂蛋白分子的氨基酸顺序,以N末端第1~11个氨基酸残基(NLVNFHRMIKL)、保守区域第51~67的17个氨基酸残基(YKRLEKRGCGTKFLSYK)和C末端第99~124个残基(ARNKTTYNKKYQYYSNKHCR-GSTPRC)为模板,由上海波泰生物工程有限公司将其合成纯度为95%的多肽N₁₋₁₁, M17, P26。多肽使用时,离心收集,溶于高压蒸气灭菌的双蒸水400 μL中,配制成10 g·L⁻¹的多肽原液,以20 μL/管分装于500 μL的Ependorf管中, -20℃冷冻保存。

2.2 杀菌活性测定 采用琼脂铺板计数法,参照文献^[4]。①取过夜培养的细菌,按照1:50加入3 mL新鲜的LB培养液中,置于37℃恒温气浴摇床中孵育2.5~3 h,达到对数生长期。②离心收集,洗涤细菌并将其沉淀物溶于500 μL生理盐水中,用紫外分光光度计测得吸光度达0.1时所需的细菌量(微升),根据公式计算稀释倍数。③配制细菌孵育体系,吸取多肽和细菌(1×10⁹ CFU/L)各10 μL加入RPMI-1640反应体系(总体积为100 μL, 10 mmol·

L⁻¹Hepes,1 mmol·L⁻¹CaCl₂,1% BSA,pH 7.4),混匀后 37 ℃水浴孵育 2.5 h。④2.5 h 后,从该体系中取出 40 μL 加入 360 μL 高压灭菌的生理盐水中,连续 10 倍稀释,共 3 次。⑤从每次稀释液中取出 100 μL 放置无菌培养皿(60 mm)中,加入 5 mL 约 55 ℃高压灭菌 LB 营养琼脂摇匀,待凝固后,放置于 37 ℃温箱培养。⑥18 ~ 24 h 后取出计算细菌菌落数(colony-forming units, CFU),计算不同浓度衍生多肽的杀菌率,并制作杀菌方程。每组实验重复 5 次,取平均值。

杀菌率 = (对照组 CFU - 实验组 CFU)/对照组 CFU × 100%

2.3 统计学分析 采用 Bliss 法绘制杀菌回归方程,计算 ED₅₀,使用 SPSS 13.0 中完全随机设计的方差分析对所得结果进行统计学分析,*P* < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 II A 型 PLA₂ 衍生肽 M17, P26, N₁₋₁₁ 的结构 衍生自 II A 型 PLA₂ 的 3 个肽分子均为碱性分子,且携带净正电荷,其氨基酸的组成中含较多碱性氨基酸,没有(N₁₋₁₁和 P26 肽分子)或极少的酸性氨基酸(M17 肽分子中含有一个酸性氨基酸谷氨酸)。如表 1。

表 1 II A 型 PLA ₂ 衍生肽 M17, P26, N ₁₋₁₁ 的结构			
名称	结构	净碱性氨基酸 所占比例/%	净正 电荷
M17	YKRLEKRCGCTKFLSYK	29.40	5
P26	ARNKTTYNKKYQYYSNKHCRGSTPRC	30.80	8
N ₁₋₁₁	NLVNFHRMIKL	27.20	3

3.2 M17 肽分子对 G⁺ 菌和 G⁻ 菌的杀菌活性 M17 分子对细菌的敏感度由高到低依次为:枯草杆菌 > 金黄色葡萄球菌 > 屎肠球菌;大肠杆菌 > 绿脓杆菌 > 鲍曼不动杆菌。M17 肽分子对枯草杆菌的杀菌效果与金黄色葡萄球菌、屎肠球菌比较有明显的统计学差异(*P* < 0.01);M17 肽分子对大肠杆菌的杀菌效果与鲍曼不动杆菌、绿脓杆菌比较差异有统计学意义(*P* < 0.05),鲍曼不动杆菌与绿脓杆菌比较差异有统计学意义(*P* < 0.05)。II A 型 PLA₂M17 对 G⁺ 菌与 G⁻ 菌均有较强的杀菌活性。见表 2。

3.3 M17, P26, N₁₋₁₁ 杀菌作用比较

3.3.1 对金黄色葡萄球菌的杀菌效果 M17 肽分子对金黄色葡萄球菌的杀菌效果与 P26 比较差异有

统计学意义(*P* < 0.05)。M17 肽分子对金黄色葡萄球菌的杀菌活性强于 P26 及 N₁₋₁₁。见表 3。

表 2 M17 对 G ⁺ 菌和 G ⁻ 菌的杀菌回归方程及 ED ₅₀		
细菌	杀菌回归方程	ED ₅₀ /mg·L ⁻¹
枯草杆菌	<i>Y</i> = 1.464 <i>X</i> + 3.795	6.65
金黄色葡萄球菌	<i>Y</i> = 1.152 <i>X</i> + 3.419	23.57
屎肠球菌	<i>Y</i> = 0.836 <i>X</i> + 3.832	24.95
大肠杆菌	<i>Y</i> = 0.877 <i>X</i> + 4.054	12.00
鲍曼不动杆菌	<i>Y</i> = 1.094 <i>X</i> + 3.371	30.83
绿脓杆菌	<i>Y</i> = 1.027 <i>X</i> + 3.626	21.77

表 3 3 种多肽对金黄色葡萄球菌的杀菌回归方程及 ED ₅₀		
多肽	杀菌回归方程	ED ₅₀ /mg·L ⁻¹
M17	<i>Y</i> = 1.152 <i>X</i> + 3.418	23.57
P26	<i>Y</i> = 0.915 <i>X</i> + 2.766	276.39 ¹⁾
N ₁₋₁₁	<i>Y</i> = 1.389 <i>X</i> + 1.668	250.52 ^{1,2)}

注:与 M17 ED₅₀ 比较¹⁾ *P* < 0.05。

3.3.2 3 种多肽对大肠杆菌的杀菌效果 M17 肽分子对大肠杆菌的杀菌效果与 P26, N₁₋₁₁ 比较有明显的统计学差异(*P* < 0.01),P26 与 N₁₋₁₁ 比较差异有统计学意义(*P* < 0.05)。M17 肽分子对大肠杆菌的杀菌活性明显强于 P26 及 N₁₋₁₁, N₁₋₁₁ 和 P26 对 G⁺ 菌有较强的杀菌活性,但对 G⁻ 菌杀菌活性较弱。见表 4。

表 4 3 种多肽对大肠杆菌的杀菌回归方程及 ED ₅₀		
多肽	杀菌回归方程	ED ₅₀ /mg·L ⁻¹
M17	<i>Y</i> = 0.882 <i>X</i> + 4.049	11.97 ³⁾
P26	<i>Y</i> = 1.327 <i>X</i> + 1.437	484.18 ¹⁾
N ₁₋₁₁	<i>Y</i> = 0.881 <i>X</i> + 2.903	240.02 ^{1,2)}

注:与 M17 ED₅₀ 比较¹⁾ *P* < 0.01;与 P26 ED₅₀ 比较²⁾ *P* < 0.05,
³⁾ *P* < 0.01。

4 讨论

针对 II A 型 PLA₂ 的研究已经有较长的历史,但认识到它具有杀菌作用才有 10 多年。本课题组对它在体内和体外的杀菌作用,它的杀菌机制和在生物体内的存在情况进行过一系列的研究,对它的抗菌谱和抗菌活性强度,以及在生物体防御细菌感染方面具有一定的认识^[4-7]。其他学者也对 II A 型 PLA₂ 的杀菌作用也有广泛和深入的研究^[8]。但是,这些研究都是针对完整 II A 型 PLA₂ 分子进行的研究,而由 II A 型 PLA₂ 分子衍生出的多肽是否也可以具有杀菌作用,它们的结构有什么特点等,一直未见研究报道。本课题组从 2011 年开始就这一问题展

开研究,发现了从ⅡA型PLA₂衍生出的两个多肽分子具有较强的杀菌作用,并进行了报道^[9-10]。

在本项研究中,基于抗菌肽结构的普遍特点,根据人ⅡA型PLA₂的一级结构(第51~67氨基酸顺序),这一片段也是灵长类生物ⅡA型PLA₂完全保守区域,设计出一个17肽M17分子,并进行杀菌活性的测定,与先前发现的2个抗菌肽分子N₁₋₁₁和P26相比,它对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的杀菌活性更强。在这3个衍生于人ⅡA型PLA₂的抗菌肽分子,它们的结构都具有一个共同的特点,就是组成多肽的氨基酸含有相对较多的碱性氨基酸,如赖氨酸,精氨酸和组氨酸,故肽分子带净正电荷,这与绝大多数抗菌肽相似^[1]。然而,各种抗菌肽的抗菌活性和抗菌谱有很大差别,这说明抗菌肽分子除了含有较多碱性氨基酸外这与共同特点外,还有着其它结构因素影响它的活性。在笔者研究的3个抗菌肽分子,M17所带的净正电荷不是最多的,碱性氨基酸所占的比例也不是最高的,但是它对大肠杆菌的杀菌作用却明显高过N₁₋₁₁和P26,这说明简单增加肽分子中碱性氨基酸的比例并不能增加它的杀菌活性,其他的结构因素,如α-螺旋,亲水性和疏水性等,都有可能影响到抗菌肽的杀菌强度。

M17分子虽然衍生于人ⅡA型PLA₂,但在结构和功能上有许多差别。人ⅡA型PLA₂由124个氨基酸残基组成,有着复杂的空间结构,而M17分子是由17个氨基酸残基组成,它是根据人ⅡA型PLA₂蛋白分子一级结构中第51到67位氨基酸合成的。在杀菌作用上,人ⅡA型PLA₂对革兰阳性菌有很强的杀菌作用,但对革兰阴性菌作用很弱^[6],M17的杀菌作用整体上比人ⅡA型PLA₂弱,但它对革兰阳性菌和革兰阴性菌的作用强度没有区别,这也与之前发现的抗菌肽N₁₋₁₁和P26有明显区别,它们也是对革兰阳性菌的作用强,对革兰阴性菌作用弱^[9-10]。M17对革兰阳性菌和阴性菌都有着较强的作用,可能与它的结构更易于结合于细菌表面有关,进一步分析它们结构上的特点,可能会有助于今

后开发出广谱的抗菌肽。

[参考文献]

- [1] Baltzer S A, Brown M H. Antimicrobial peptides: promising alternatives to conventional antibiotics [J]. Mol Microbiol Biotechnol, 2011, 20(4): 228.
- [2] Brouwer C P, Rahman M, Welling M M. Discovery and development of a synthetic peptide derived from lactoferrin for clinical use [J]. Peptides, 2011, 32(9): 1953.
- [3] 李艳,梁宁生. 血小板型磷脂酶A₂抗菌活性的研究进展[J]. 国外医学:临床生物化学与检验学分册, 2005(10): 694.
- [4] Weinrauch Y A, Bad C, Liang N S, et al. Mobilization of potent plasma bactericidal activity during systemic bacterial challenge. Role of group II A phospholipase A₂ [J]. J Clin Invest, 1998, 102(3): 633.
- [5] Koprivnjak T, Peschel A, Gelb M H, et al. Role of charge properties of bacterial envelope in bactericidal action of human group II A phospholipase A₂ against Staphylococcus aureus [J]. J Biol Chem, 2002, 277(49): 47636.
- [6] 梁宁生,李艳,杨帆,等. 重组人血小板型磷脂酶A₂杀菌作用的研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2004, 14(10): 1081.
- [7] 苏启表,梁宁生,杨帆等. II型、V型、X型磷脂酶A₂ mRNA在大鼠消化系统中的分布[J]. 中华消化杂志, 2004(8): 503.
- [8] Wu Y, Raymond B, Goossens P L, et al. Type-II A secreted phospholipase A₂ is an endogenous antibiotic-like protein of the host [J]. Biochimie, 2010, 92(6): 583.
- [9] 何瑞林,梁宁生. 人ⅡA型磷脂酶A₂衍生肽P26抗菌作用与结构修饰的研究[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(9): 1300.
- [10] 安娜,梁宁生. 衍生自人ⅡA型磷脂酶A₂N端的多肽h PLA₂N₁₋₁₁杀菌活性的研究[J]. 广西医学, 2012, 34(6): 689.

[责任编辑 聂淑琴]