

两栖类动物 Cathelicidins 家族 抗菌肽研究进展

王妍^① 肖宁^② 周江^{①*} 王义鹏^{③*}

① 贵州师范大学生命科学学院 贵阳 550000; ② 贵阳护理职业学院 贵阳 550014;

③ 苏州大学药学院 苏州 215123

摘要: 两栖类动物皮肤裸露和湿润的特性易于微生物的生长, 它们为了抵御病原微生物的侵袭, 在长期自然进化过程中形成了以抗菌肽 (AMPs) 为主要防御机制的免疫系统。抗菌肽广泛分布于动物、植物、微生物中, 是生物用于抵御细菌、真菌、病毒和原虫等病原体侵袭的重要武器之一, 在进化上是一类非常古老而有效的天然防御物质。Cathelicidins 是脊椎动物特有的重要抗菌肽家族之一, 除具有高效广谱的抗菌活性, 还具有如抗炎、抗氧化、伤口修复、抑制组织损伤和促进血管生成等多种重要活性, 因此 Cathelicidins 家族抗菌肽已成为抗感染多肽类新药的研发热点。本文将从两栖类动物 Cathelicidins 家族抗菌肽的一般特点、来源分布、生物合成与结构、生物学活性、作用机制及应用前景等几个方面, 综合阐述国内外的研究动态。

关键词: 两栖类; Cathelicidins; 抗菌肽; 结构与功能; 抗菌活性

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2021) 02-303-17

Research Progress of Cathelicidins Family Antimicrobial Peptides in Amphibians

WANG Yan^① XIAO Ning^② ZHOU Jiang^{①*} WANG Yi-Peng^{③*}

① *Biology Department, Guizhou Normal University, Guiyang 550000;* ② *Guiyang Nursing Vocational College, Guiyang 550014;*

③ *College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China*

Abstract: The bare and moist characteristics of amphibian skin makes it prone to microbial infection. In order to resist the invasion of pathogenic microorganisms, amphibians form an immune system with antimicrobial peptides as the main defense effector during the long-term natural evolution. Antimicrobial peptides (AMPs) are widely distributed in animals, plants and microorganisms, which are pivotal weapons for host to resist bacteria, fungi, viruses and protozoa. AMPs represent very ancient and effective natural defense substances in

基金项目 中央引导地方科技发展资金项目 (No. [2020] 4002), 贵州省国家级地理学一流学科建设项目 (No. [2017] 85-01), 贵州省科技厅重点研发项目 (No. [2017] 5411), 科技部科技基础条件平台项目 (No. 2005DKA21402), 贵州省科技厅项目 (黔科合基础[2016]1004);

* 通讯作者, E-mail: zhoujiang@ioz.ac.cn, yipengwang@suda.edu.cn;

第一作者简介 王妍, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物生态学; E-mail: wangyan3wy@126.com。

收稿日期: 2020-08-17, 修回日期: 2020-11-26 DOI: 10.13859/j.cjz.202102015

evolution. Cathelicidins are an important family of AMPs exclusively existing in vertebrates, and they are also one of the most powerful family of AMPs known to date. Cathelicidins have been identified in most kinds of vertebrates. In addition to potent and broad-spectrum antimicrobial activities, they also possess many other important activities such as anti-inflammation, anti-oxidation, wound repair, tissue damage inhibition and angiogenesis promotion. As a result, Cathelicidins are becoming a hot spot of anti-infective peptide agent development. There is a large amount of amphibian species in nature, which contain many novel Cathelicidins family AMPs with diverse structures and functions. Therefore, it is of great significance to study amphibian Cathelicidins for animal immunology research and drug development. The present article comprehensively reviews the research progress of amphibian Cathelicidins from the aspects of general characteristics, source distribution, biosynthesis and structures, biological activities, mechanisms of action and application prospects.

Key words: Amphibian; Cathelicidins; Antimicrobial peptides; Structure; Function; antimicrobial activity

两栖动物 (Amphibians) 是一类可以同时适应水生和陆地生活的物种, 生存环境较为复杂, 皮肤特点也与哺乳动物有很大差异, 其皮肤湿润且角质层薄, 这使其容易遭受外界微生物的侵袭 (Bletz et al. 2018)。为了应对各种复杂的生存环境, 两栖动物逐渐进化出相应的防御机制: (1) 皮肤外屏障, 在环境刺激下, 可分泌多种生物活性物质于皮肤外表面, 用于抵御外界微生物的侵袭 (Liu et al. 2019); (2) 先天免疫屏障, 面对刺激可产生多种类的抗菌肽 (antimicrobial peptides, AMPs); (3) 后天免疫屏障, 面对外界微生物刺激可产生相应抗体 (Yu et al. 2013, Deng et al. 2017)。其中, 小分子抗菌肽对其生存、繁殖均具有重要作用。抗菌肽是生物体先天免疫系统产生的一类具有防御功能的小分子蛋白质, 一般含有 12 ~ 50 个氨基酸残基。抗菌肽是生物体自我保护、抵御外界微生物侵袭的重要物质。迄今为止, 在两栖动物体表分泌物中分离得到的抗菌肽已达 1 400 多种 (Shi et al. 2020)。

Cathelicidins 家族抗菌肽是脊椎动物特有的一个重要抗菌肽家族, 具有多种生物学活性, 目前已从不同两栖类动物中分离鉴定出多种具有不同生物活性的 Cathelicidins 家族抗菌肽。综合以往研究, 发现两栖类动物来源的 Cathelicidins 与其他物种来源的 Cathelicidins 在生物合成、结构与功能上既存在相似性又具有

特殊性。

1 Cathelicidins 家族抗菌肽的一般特点

Cathelicidins 家族抗菌肽几乎在所有脊椎动物物种中都有发现, 对哺乳动物来源的该家族抗菌肽的研究尤为深入。通过序列比对发现, Cathelicidins 家族抗菌肽前体结构十分保守, 由三部分组成, 包括 N-端信号肽区、中间 Cathelin 区和 C-端成熟肽区。其中, Cathelin 区高度保守, Cathelicidins 家族抗菌肽也因此得名 (Zanetti et al. 1995)。Cathelin 区中通常具有 4 个高度保守的半胱氨酸 Cys, 可形成 2 个分子内的二硫键, 为维护肽结构稳定起重要作用, 而且也是判定 Cathelicidin 肽的一个重要参考。Cathelicidins 与其他家族抗菌肽相比带正电荷的氨基酸数量多, 基本不含或含少量带负电荷的氨基酸。

Cathelicidins 家族抗菌肽一般都具有高效广谱的抗微生物活性, 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌、真菌、支原体和病毒均有抑制作用, 此外还具有许多其他生物学活性, 如抗肿瘤、抗炎、抗氧化、免疫调节、伤口修复、促进血管生成, 有些还具有中和内毒素等重要活性 (图 1) (Anastasia et al. 2009, Auvynet et al. 2009, Wuerth et al. 2011, Choi et al. 2012, Kahlenberg et al. 2013)。其在先天免疫系统中发挥着关键作用, 可以作为抵御各种微生物的

第一道防线 (Ramanathan et al. 2002, Zanetti 2005)。Cathelicidins 抗微生物机制与抗生素不同, 即其通过与病原菌细胞膜发生相互作用, 使膜结构受损, 出现孔洞, 造成细胞内物质的外泄, 进而杀死病原菌。研究两栖类动物 Cathelicidins 家族抗菌肽对动物免疫学和新药研发都具有重要意义, 非常值得予以关注。

2 两栖类动物 Cathelicidins 的来源分布

Cathelicidins 家族抗菌肽最早发现于哺乳类、鸟类、鱼类动物中, 随后在金环蛇 (*Bungarus fasciatus*) 的毒液中发现第一个爬行类 Cathelicidin 抗菌肽 Cathelicidin-BF (Wang et al. 2008)。在棕点湍蛙 (*Amolops loloensis*) 体内发现第一个两栖类动物 Cathelicidins 抗菌肽 Cathelicidin-AL (Hao et al. 2012); 2014 年又在有尾目两栖类动物红瘰疣螈 (*Tylototriton*

verrucosus) 中发现 Cathelicidin-TV (Mu et al. 2014)。相比其他脊椎动物, 两栖类动物中关于 Cathelicidins 的报道较少。

目前, 已发现来源于 14 种两栖类动物的 20 条 Cathelicidins 家族抗菌肽 (表 1), 分别来自于黑眶蟾蜍 (*Duttaphrynus melanostictus*)、中国大鲵 (*Andrias davidianus*)、云南臭蛙 (*Odorrana andersonii*)、大绿臭蛙 (*O. livida*)、腹斑倭蛙 (*Nanorana ventripunctata*)、牛蛙 (*Rana catesbeiana*)、中华蟾蜍 (*Bufo gargarizans*)、棕点湍蛙、脆皮大头蛙 (*Limnonectes fragilis*)、双团棘胸蛙 (*Paa yunnanensis*)、泽蛙 (*Fejervarya multistriata*)、红瘰疣螈、合江棘蛙 (*Paa robertingeri*) 和普洱泛树蛙 (*Polypedates puerensis*)。本实验室前期研究发现了合江棘蛙、脆皮大头蛙、大绿臭蛙、牛蛙和泽蛙来源的 10 条 Cathelicidins 抗菌肽。

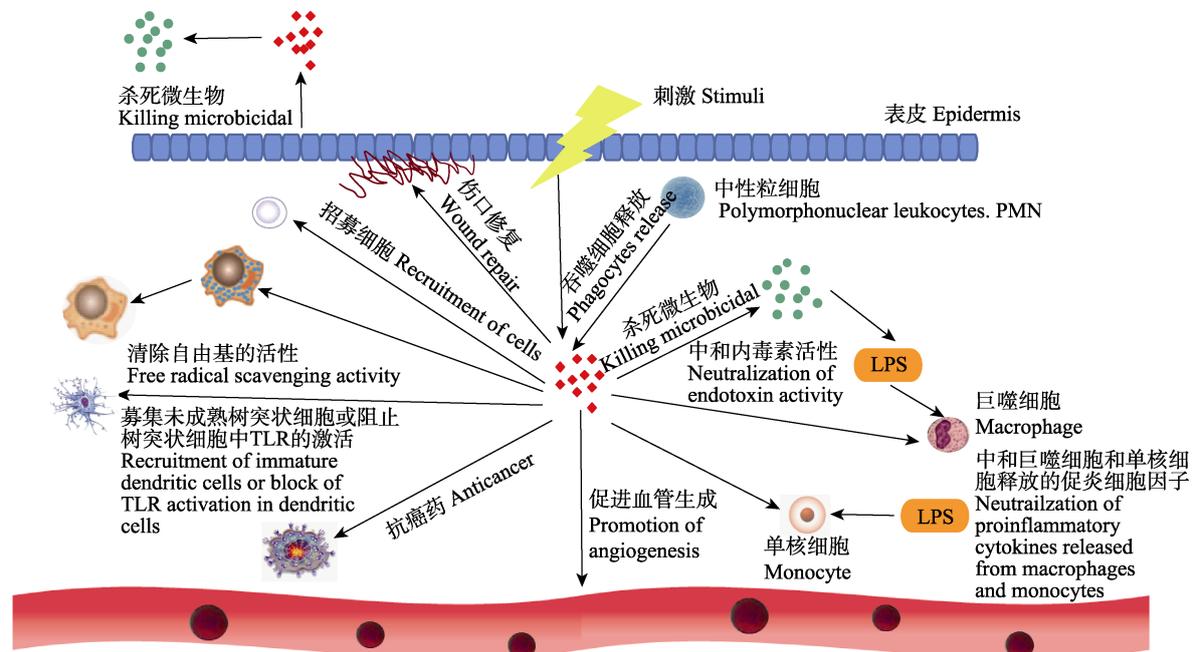


图 1 Cathelicidins 家族抗菌肽的功能多样性 (引自 Lai et al. 2009)

Fig. 1 Functional diversity of Cathelicidins family AMPs (from Lai et al. 2009)

LPS. 脂多糖 LPS. Lipopolysaccharide

表 1 两栖类动物 Cathelicidins 家族抗菌肽

Table 1 Antimicrobial peptides from Cathelicidins family of amphibians

物种 Species	多肽 Peptide	结构 Structure	成熟肽序列 Mature peptide sequence	参考文献 References
牛蛙 <i>Rana catesbeiana</i>	Cathelicidin-RC1 Cathelicidin-RC2	α -螺旋 α -helical	KKCKFFCKVKKKIKSIGFQIPIVSIPFK KKCGFFCKLKNLKLSTGSRSNIAAGTHGGTFRV	Ling et al. 2014
双团棘胸蛙 <i>Paa yunnanensis</i>	Cathelicidin-PY		RKCNFLCKLKEKLRTVITSHIDK VLRPQG	Wei et al. 2013
云南臭蛙 <i>Odorrana andersonii</i>	Cathelicidin-OA1		IGRDPTWSHLAASCLKCIFDDLPKTHN	Cao et al. 2018
合江棘蛙 <i>P. robertingeri</i>	Cathelicidin-PR1 Cathelicidin-PR2		RKCNLFCKAKQKLSLSSVIGTVVHPPRG KECKDYLCLLMMLGSSSHI ESIDP	Luo et al. 2019
脆皮大头蛙 <i>Limnonectes fragilis</i>	Lf-CATH1 Lf-CATH2		PPCRGIFCRRVGSSSAIARPGKTLSTFITV GKCNVLCQLKQKLSIGSGHIGSVVLPBG	Yu et al. 2013
泽蛙 <i>Fejervarya multistriata</i>	FM-CATH1 FM-CATH2		RTRRAIKLKTkVLNKLKQKLQAVGNLIGSVIKA RTRRAIKLKTkALNKLKQKLQAVGNLIGSVIKG	Wang et al. 2017
棕点湍蛙 <i>Amolops loloensis</i>	Cathelicidin-AL	伸展螺旋 Extended-helical	RRSRRRGGGRRGGSGRRGGGRRSGAGSSIAGVGS RGGGGGRHYA	郝雪 2011
中华蟾蜍 <i>Bufo gargarizans</i>	BG-CATH29 BG-CATH37	无规卷曲 Random coil	NGKKKRKKPEKLCMKPGACSVIFDASVNE SSRRPCRGRSCGPRLRGGYTLIGRPVKQNRPKYMWV	Sun et al. 2015
黑眶蟾蜍 <i>Duttaphrynus melanostictus</i>	Cathelicidin-DM		SSRRKPCGWLCKLKLGGYTLIGSATNLNRPTYVRA	Shi et al. 2020
大绿臭蛙 <i>O. livida</i>	OL-CATH1 OL-CATH2	α -螺旋 α -helical	KKCKGYCRPVGFSPPISRRINDSENIYLPFGV RKCNFLCKVKNLKSvGSKSLIGSATHHGIYRVA	Qi et al. 2018
腹斑倭蛙 <i>Nanorana ventripunctata</i>	Cathelicidin-NV	环状结构 Loop-structured	ARGKKECKDDRCRLMLKRGFSFYV	Wu et al. 2018
普洱泛树蛙 <i>Polypedates puerensis</i>	Cathelicidin-PP	β -折叠 β -sheet	ASENGKCNLLCLVKKLRAVGNVIKTVVGKIA	Mu et al. 2017
红瘰疣螈 <i>Tylostotriton verrucosus</i>	Tylotoin		KCVRQNNKRVCCK	Mu et al. 2014
中国大鲵 <i>Andrias davidianus</i>	AdCath		RPKKVQGRKAEKDNGDGTAAANASGKKKSSNVFK	Yang et al. 2017

3 两栖类动物 Cathelicidins 家族抗菌肽的生物合成与结构

抗生素的合成一般是通过复杂的酶促反应，而抗菌肽的合成却与之不同，是由基因编码的前体肽（precursor）生成的，在信号肽酶作用下，信号肽被切除，成熟肽通过分泌途径被分泌到细胞外（Zanetti et al. 1995）。两栖类动物来源的 Cathelicidins 与其他物种来源的 Cathelicidins 在生物合成上具有差异性。弹性蛋白酶（elastase）通常是鱼类、鸟类和哺乳类动物体内负责切割 Cathelicidins 前体释放成熟

肽的蛋白酶，此酶作用位点通常在缬氨酸 Val 与丙氨酸 Ala 之间（Shinnar et al. 2003）。但是也存在例外，如人 LL-37 成熟肽的切割和释放则是由丝氨酸蛋白酶 3 负责（王永东 2007）。参与两栖类动物 Cathelicidins 前体肽切割和成熟肽释放的酶与其他动物存在差异，多为类胰蛋白酶（trypsin-like protease），少数为弹性蛋白酶，其酶切位点一般为精氨酸 Arg、赖氨酸 Lys（广慧娟 2013, Wei et al. 2013）。如作用于黑眶蟾蜍来源的 Cathelicidin-DM 的酶即为弹性蛋白酶，切割位点为 Lys、Arg（Shi et al. 2020）。棕点湍蛙中 Cathelicidin-AL 的酶作用

位点为 Val (Hao et al. 2012), 双团棘胸蛙中 Cathelicidin-PY 的酶作用位点为 Lys (Wei et al. 2013), 红瘰疣螈来源的 Tylotoxin 的酶切位点为 Arg (Mu et al. 2014), 中华蟾蜍来源的 BG-CATHs 的酶切位点为 Arg、Lys (Sun et al. 2015)。

研究证明, 编码 Cathelicidins 的基因包括 3 个内含子和 4 个外显子 (Sun et al. 2015)。前导序列由前 3 个外显子编码, 成熟肽序列是由第 4 个外显子编码 (图 2)。

前体肽由三部分构成, N-端信号肽区域、Cathelin 区域和 C-末端成熟肽区域 (Zanetti et al. 2000, Yang et al. 2001)。其中 Cathelin 区域高度保守, 所含天冬氨酸 Asp 和谷氨酸 Glu 残基数量较多, 推测其在前体肽阶段能够中和 C-末端带正电的成熟肽区域, 使前体肽以无活性状态存在, 以减少其对自身健康细胞的毒害。通常不同物种来源的 Cathelicidins 成熟肽具有高度特异性。通过序列比对发现, 两栖类动物与其他生物来源的 Cathelicidins 在成熟肽的结构和序列组成上均存在差异, 除棕点湍蛙来源的 Cathelicidin-AL、中国大鲵来源的 AdCath 和泽蛙来源的 FM-CATH1 与 FM-CATH2 不含半胱氨酸 Cys, 其余两栖类动物来源的 Cathelicidins 成熟肽区均含有两个保守的 Cys, 可形成一对分子内二硫键, 而其他动物来源的 Cathelicidins 成熟肽区通常不含 Cys, 不形成分

子内二硫键, 这是两栖类动物 Cathelicidins 在结构上的特殊之处。图 3 为两栖类动物来源 Cathelicidins 的多序列比对。图 4 为两栖类动物来源编码 Cathelicidins 的核苷酸多序列比对。

有一些两栖类动物 Cathelicidins 的成熟肽序列富含特殊氨基酸, 如棕点湍蛙来源的 Cathelicidin-AL, 其成熟肽区域的甘氨酸 Gly 和 Arg 含量较高, 分别含有 37.5% 的 Gly 和 23% 的 Arg。中华蟾蜍来源的 BG-CATH29 的成熟肽则富含 Lys (24%)。牛蛙来源的 Cathelicidin-RC1 的成熟肽含有大量带正电荷的 Lys, 约为 32%, 且不含有带负电的氨基酸。图 5 为两栖类与其他动物来源的 Cathelicidins 序列进化树分析。

Cathelicidins 家族抗菌肽结构多样, 在疏水环境中会显现出二级结构, 两栖类动物 Cathelicidins 二级结构主要分为 4 类, α -螺旋 (α -helical)、 β -折叠 (β -sheet)、环状结构 (loop-structured) 和伸展螺旋 (extended-helical)。 α -螺旋型 Cathelicidins 多以 α -螺旋结构为主, 其 N-端、C-端分别含有较多亲水、疏水氨基酸, 拥有较好的两亲性, 一般无二硫键结构存在 (广慧娟等 2012)。在水溶液中常以松散结构形式存在, 但是在与生物膜相互接触时会折叠成两亲性的螺旋结构 (Turner et al. 1998)。本实验室前期研究发现合江棘蛙、大绿臭蛙中的部分 Cathelicidins 属于 α -螺旋型, 如

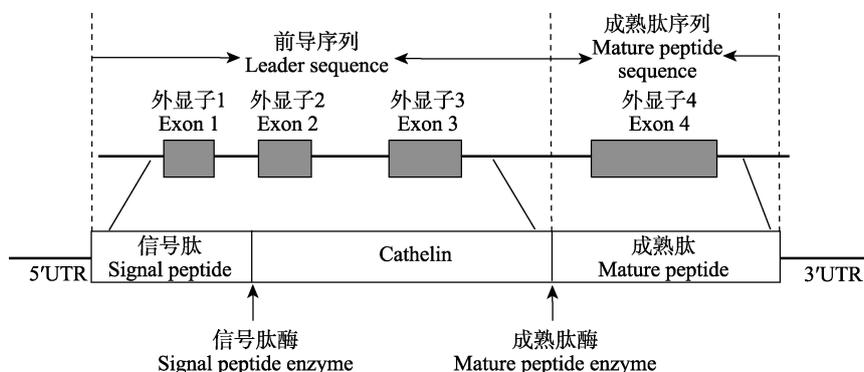


图 2 Cathelicidins 的基因结构和前体肽 (引自郝雪 2011)

Fig. 2 Structural organization of Cathelicidin genes and precursors (from Hao 2011)

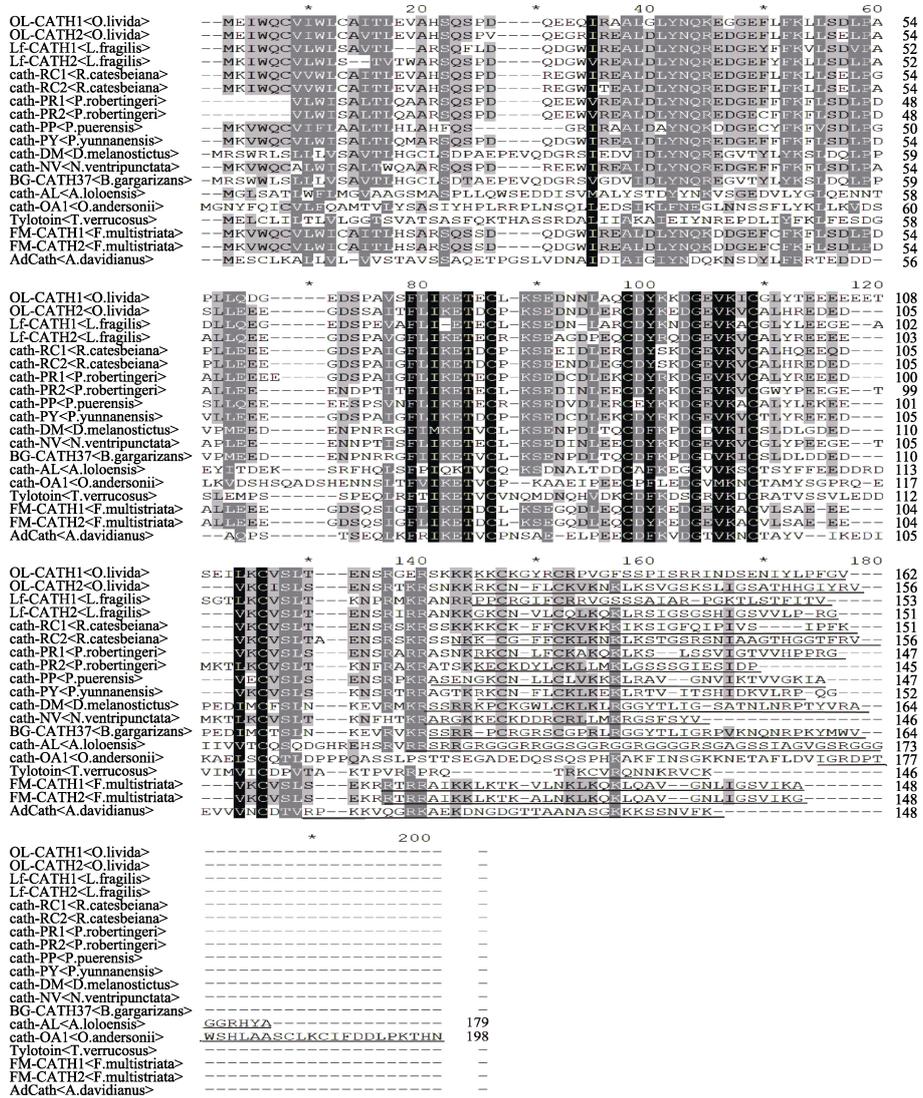


图 3 两栖类动物来源 Cathelicidins 前体的多序列比对

Fig. 3 Multiple Sequence Alignment of Cathelicidins Precursors from Amphibians

图中标色区域，颜色越深表示相似度越高，黑色底色部分表示相同氨基酸，灰色底色部分表示相似氨基酸；成熟肽序列以下划线标出；“-”表示此位置无氨基酸。序列上方星号与数字均标示此处氨基酸在序列中处第几位，间隔为 10，交替出现。图右侧数字标示此行最后一位氨基酸在此序列中处于第几位。图左侧内容为抗菌肽名称缩写，尖括号内为物种学名缩写：O. livida. 大绿臭蛙 *Odorrana-livida*; L. fragilis. 脆皮大头蛙 *Limnometes fragilis*; R. catesbeiana. 牛蛙 *Rana catesbeiana*; P. robertingeri. 合江棘蛙 *Paa robertingeri*; P. puerensis. 普洱泛树蛙 *Polypedates puerensis*; P. yunnanensis. 双团棘胸蛙 *Paa yunnanensis*; D. melanostictus. 黑眶蟾蜍 *Duttaphrynus melanostictus*; N. ventripunctata. 腹斑倭蛙 *Nanorana ventripunctata*; B. gargarizans. 中华蟾蜍 *Bufo gargarizans*; A. loloensis. 棕点湍蛙 *Amolops loloensis*; O. andersonii. 云南臭蛙 *Odorrana andersonii*; T. verrucosus. 红瘰疣螈 *Tylostotriton verrucosus*; F. multistriata. 泽蛙 *Fejervarya multistriata*; A. davidianus. 中国大鲵 *Andrias davidianus*。

In the colored area of the figure, the darker color indicates the higher similarity, the black background indicates the same amino acid, and the gray background indicates the similar amino acid. The mature peptide sequence is underlined. “-” means there is no amino acid at this position. The asterisk and the number above the sequence indicate the position of the amino acid in the sequence, and the interval is 10, appearing alternately. The number on the right side of the figure indicates where the last amino acid of this line is in the sequence. The left side of the figure is the abbreviated name of the antimicrobial peptide, and the abbreviation of the scientific name of the species is in the angle brackets.

```

OL-CATH1<O.livida> ATGGAATCTGG---CAGTGGGCAATGCGCTGTGTAATCACATTGAGG---TGGCTCACTTCATCTCCAGATCAGGAGG--- 79
OL-CATH2<O.livida> ATGCAATCTGG---CAGTGGGCAATGCGCTGTGCAATCACATTGAGG---TGGCTCACTTCAGTCTCCAGTTCAGGAA--- 79
LF-CATH1<L.fragilis> ATGAAATCTGG---CAGTGGGCAATGCGCTTCCAGTCAAGTGG-----CTCGCTTCAGTTCCTGATCAGGAC--- 73
LF-CATH2<L.fragilis> ATGAAATCTGG---CAGTGGGCAATGCGCTTCCAAGTCAATG-----GGCTCGCTTCAGTCTCCGATCAGGAC--- 73
cath-RC1<R.catesbeiana> ATGAAATCTGG---CAGTGGGCAATGCGCTGTGCAATCACATTGAGG---TGGCTCACTTCAGTCTCCGATCAGGAA--- 79
cath-RC2<R.catesbeiana> ATGAAATCTGG---CAGTGGGCAATGCGCTGTGCAATCACATTGAGG---TGGCTCACTTCAGTCTCCGATCAGGAA--- 79
cath-PR1<P.robertingeri> -----GFGGCAATGCAATCCGCTCTCAG-----GCTTCAGTCTCCGATCAGGAA--- 49
cath-PR2<P.robertingeri> -----GFGGCAATGCAATCCGCTCTCAGATTGAGG---CGGCTCGCTTCAGTCTCCGATCAGGAA--- 63
cath-PP<P.puerensis> ATGAAATCTGG---CAGTGGGCAATTTTAGCGGCTCAACATTGACACC---TGGCTCACTTCAGTCTCCGATCAGGAA--- 67
cath-PY<P.yunnanensis> ATGAAATCTGG---CAGTGGGCAATGCAATCCGCTCTCAGATTGAGG---TGGCTCGCTTCAGTCTCCGATCAGGAA--- 79
cath-DM<D.melanostictus> ATCAGAGCTGAGGCTGTCTCCGCGCTGCTCTCTGAGTCAACATTACAG---GCTGTCTCTTCACCCCTCAAGAGGCTCAGGT 83
cath-NV<N.ventripunctata> ATCAGAGCTGAGG---CAGTGGGCAATGCAATCCGCTCTCAGATTGAGG---CGGCTCGCTTCAGTCTCCGATCAGGAA--- 79
BG-CATH37<B.gargarizans> ATCAGAGCTGAGG---CTGTCTCCGCGCTCTCTCTGTCACATTACAG---GCTGTCTCTTCAGTCTTCAGGAGGCTGAGT 80
cath-AL<A.loloensis> ATGGGCTCTCTGCAACTCTCTCTCTCTATGGGGTGGGGCGCGCAGCA---TGGG---CTTACATTATTACAGTGGAGTA 80
cath-OA1<O.andersonii> ATGGGAATACTTCCAGATCTGCGCTTTTTCAGGAAAGCAGTTTTGTATTCTCATCTCAATTGAGGAGCC 86
Tylotoin<T.verrucosus> ATGCACTAAGCCTCATACTCACAAGTCTGTTGGTGGGACTTGGTAGCCACCTCGGCTCTCCAAAGAACCATCGAAGTAG 86
FM-CATH1<F.multistriata> ATGAAATCTGG---CAGTGGGCAATGCAATCCGCTCTCAGATTGAGG---CAGGCTCGCTTCAGTCTCCGATCAGGAA--- 79
FM-CATH2<F.multistriata> ATGAAATCTGG---CAGTGGGCAATGCAATCCGCTCTCAGATTGAGG---CAGGCTCGCTTCAGTCTCCGATCAGGAA--- 79
AdCath<A.davidianus> ATGCAAGCTGCTTGAAGCCCGGCGGCTGTTTGTGTCAAGCTGTCACTCAGGAAAATCCAGGAAGTCT 80

```

```

OL-CATH1<O.livida> ---AACAA-----TCAGAGCTGCTCCGCTCTCAACCCAGTAG---GATGTTGGAGAGTTTAACTTAAAGTCCCTGCTCT 151
OL-CATH2<O.livida> GACGCA-----TCAGAGAGGCTCTCCGCTCTCAACCCAGAGA---GATGTTGGAGAGTTTAACTTAAAGTCCCTGCTCT 151
LF-CATH1<L.fragilis> ---GGTGA-----TCAGAGAGGCTCTCCGCTCTCAACCCAGAGG---GATGTTGGAGAGTTTAACTTAAAGTCCCTGCTCT 145
LF-CATH2<L.fragilis> ---GGTGA-----TCAGGAGGCTCTCCGCTCTCAACCCAGAGG---GATGTTGGAGAGTTTAACTTAAAGTCCCTGCTCT 145
cath-RC1<R.catesbeiana> ---GATGA-----TCAGAGAGGCTCTCCGCTCTCAACCCAGAGA---GATGTTGGAGAGTTTAACTTAAAGTCCCTGCTCT 151
cath-RC2<R.catesbeiana> ---GATGA-----TCAGAGAGGCTCTCCGCTCTCAACCCAGAGA---GATGTTGGAGAGTTTAACTTAAAGTCCCTGCTCT 151
cath-PR1<P.robertingeri> ---AATGG-----TCAGAGAGGCTCTCCGCTCTCAACCCAGAGG---GATGTTGGAGAGTTTAACTTAAAGTCCCTGCTCT 121
cath-PR2<P.robertingeri> ---AATGG-----TCAGAGAGGCTCTCCGCTCTCAACCCAGAGG---GATGTTGGAGAGTTTAACTTAAAGTCCCTGCTCT 135
cath-PP<P.puerensis> ---GATGA-----TCAGAGAGGCTCTCCGCTCTCAACCCAGAGG---GATGTTGGAGAGTTTAACTTAAAGTCCCTGCTCT 139
cath-PY<P.yunnanensis> ---GGTGA-----TCAGAGAGGCTCTCCGCTCTCAACCCAGAGG---GATGTTGGAGAGTTTAACTTAAAGTCCCTGCTCT 151
cath-DM<D.melanostictus> CCAAGATGAAGATCTTAGAAGATCTAGAGCCTCTCAACCCAGAGG---GATGTTGGAGAGTTTAACTTAAAGTCCCTGCTCT 166
cath-NV<N.ventripunctata> ---AATGA-----TCAGAGAGGCTCTCCGCTCTCAACCCAGAGG---GATGTTGGAGAGTTTAACTTAAAGTCCCTGCTCT 151
BG-CATH37<B.gargarizans> CCAAGATGAAGATCTTAGAAGATCTAGAGCCTCTCAACCCAGAGG---GATGTTGGAGAGTTTAACTTAAAGTCCCTGCTCT 163
cath-AL<A.loloensis> GGATGATCTCCGCTCAAGGCGCTTACAGCAGCAGATTATAGAAAGTCTCCGAGAGCGTCTCAATGGGCTCCAGAGCA 166
cath-OA1<O.andersonii> GCATCACTCCGAGTTACGGAAGATTTAAAGAAATATGATAGGACTTAAATCAAGTTCCTCAAGGCTTCCGAGTCA 172
Tylotoin<T.verrucosus> CCGAGATCCCTTGATCAAGCCAGGCTAAGAACTTCAACCCAGAGG---CCGATCTAATTTAATTAAGTCTTGAATCTCT 169
FM-CATH1<F.multistriata> ---GGTGA-----TCAGAGAGGCTCTCCGCTCTCAACCCAGAGG---GATGTTGGAGAGTTTAACTTAAAGTCCCTGCTCT 151
FM-CATH2<F.multistriata> ---GGTGA-----TCAGAGAGGCTCTCCGCTCTCAACCCAGAGG---GATGTTGGAGAGTTTAACTTAAAGTCCCTGCTCT 151
AdCath<A.davidianus> CGTAGAACAC---GCTATGACATAGCTATGCACTTCAATGATCAG---AAGATCTCTGATCCTTAAAGGCTTACGCAAG 160

```

```

OL-CATH1<O.livida> ATCTCCGAGCCC---CCCTTCGCGAGGAGGAG---AAGATCTCCAGGGTCTCTTTCCATATAAGGAGACAGAAATCTCTCA 229
OL-CATH2<O.livida> AGCTCCGAGCCT---CCCTTCGCGAGGAGGAG---AAGATCTCCAGGATCACTTTCTGATAAAGGAGACAGGATCTGCCCA 229
LF-CATH1<L.fragilis> ATCTCCGAGCCG---AAGTCCCGAGGAGGAG---AAGATCTCCGAGGATCG---CATTTCTGATAAAGGAGACAGGATCTGCCA 223
LF-CATH2<L.fragilis> ATCTCCGAGCCG---CCCTTCGCGAGGAGGAG---GAGATCTCCAGGATCG---GTTTCTGATAAAGGAGACAGGATCTGCCA 223
cath-RC1<R.catesbeiana> AGCTCCGAGCCT---CCCTTCGCGAGGAGGAG---AAGATCTCCAGGATCG---GTTTCTGATAAAGGAGACAGGATCTGCCCA 229
cath-RC2<R.catesbeiana> AGCTCCGAGCCT---CCCTTCGCGAGGAGGAG---GAGATCTCCAGGATCG---GTTTCTGATAAAGGAGACAGGATCTGCCCA 229
cath-PR1<P.robertingeri> ATCTCCGAGCAGGAGCCGCTCCGAGGAGGAG---AAGATCTCCAGGATCG---GTTTCTGATAAAGGAGACAGGATCTGCCCA 206
cath-PR2<P.robertingeri> ATCTCCGAGCAGG---CCCTTCGCGAGGAGGAG---AAGATCTCCAGGATCG---GTTTCTGATAAAGGAGACAGGATCTGCCA 210
cath-PP<P.puerensis> ATCTCCGAGGCT---CCCTTCGCGAGGAGGAG---AAGATCTCCAGGATCG---ACTTTTAAATCAAGGAGACAGGATCTGCCA 217
cath-PY<P.yunnanensis> ATCTCCGAGCAGG---GTTTCTGCGAGGAGGAG---AAGATCTCCAGGATCG---GTTTCTGATAAAGGAGACAGGATCTGCCA 229
cath-DM<D.melanostictus> AGCTCCGAGCCT---TTCCAAAGGAGGAGGAG---AAGATCTCCAGGAGAG---GTTTCTGATAAAGGAGACAGGATCTGCCA 244
cath-NV<N.ventripunctata> ATCTCCGAGCCG---CCCTTCGCGAGGAGGAG---AAGATCTCCAGGATCG---GTTTCTGATAAAGGAGACAGGATCTGCCA 226
BG-CATH37<B.gargarizans> AGCTCCGAGCCT---TTCCAAAGGAGGAGGAG---AAGATCTCCAGGAGAG---GTTTCTGATAAAGGAGACAGGATCTGCCA 241
cath-AL<A.loloensis> ACAAATCAAAATACATGACTCAAGCAAAATCTCC---CTTCTATGACTTCTTCCCTCCCAATAAAGGAGGATCTGCCA 244
cath-OA1<O.andersonii> TGGATTCACACA---GTCAGGCAATTTCCCAT---AAAATAATGACTTACC---TTTCTATTAAGGAGACAGGATCTGCCA 247
Tylotoin<T.verrucosus> AGCTCCGAGCCTGGAATGCTTCC---AGCTCTGAGGAGCTCCGCTTACCAATTAAGGAGACAGGATCTGCCA 238
FM-CATH1<F.multistriata> ATCTCCGAGATG---CCCTTCGCGAGGAGGAG---AAGATCTCCAGGATCG---GTTTCTGATAAAGGAGACAGGATCTGCCA 229
FM-CATH2<F.multistriata> ATCTCCGAGATG---CCCTTCGCGAGGAGGAG---AAGATCTCCAGGATCG---GTTTCTGATAAAGGAGACAGGATCTGCCA 229
AdCath<A.davidianus> ATGAGATGCCA---GGCTCA-----AATTCTCAAGGCTGAACTTAGATTCAGAAAGAGGCTGTCGCA 226

```

```

OL-CATH1<O.livida> AATCTG---AGTAATAATTTGGCCCAATCTCACTCAAAAGGACGGGGAGTGAAGATCTGTGGA-TTCTACAGCAGGAGG 310
OL-CATH2<O.livida> AATCTG---AGGCAATGACTTGGAGAGATGCTCACTCAAAAGGACGGGGAGTGAAGATCTGTGGA-TTCTACAGCAGGAGG 310
LF-CATH1<L.fragilis> AATCTG---AGTAATAATTTGGCCCGGCTCACTCAAAAGGACGGGGAGTGAAGATCTGTGGA-TTCTACAGCAGGAGG 304
LF-CATH2<L.fragilis> AATCTG---AGCCGGTCCACCCGAGGATCTCACTCAAAAGGACGGGGAGTGAAGATCTGTGGA-TTCTACAGCAGGAGG 304
cath-RC1<R.catesbeiana> AATCTG---AGGCAATGACTTGGAGGATGCTCACTCAAAAGGACGGGGAGTGAAGATCTGTGGA-TTCTACAGCAGGAGG 310
cath-RC2<R.catesbeiana> AATCTG---AGGCAATGACTTGGAGGATGCTCACTCAAAAGGACGGGGAGTGAAGATCTGTGGA-TTCTACAGCAGGAGG 310
cath-PR1<P.robertingeri> AATCTG---AGACTGCACTTGGAGAAATGCTCACTCAAAAGGACGGGGAGTGAAGATCTGTGGA-TTCTACAGCAGGAGG 286
cath-PR2<P.robertingeri> AATCTG---AGATATCACTTGGAGAAATGCTCACTCAAAAGGACGGGGAGTGAAGATCTGTGGA-TTCTACAGCAGGAGG 291
cath-PP<P.puerensis> AATCTG---AGGCGTTCCTTGGAGGATGCTCACTCAAAAGGACGGGGAGTGAAGATCTGTGGA-TTCTACAGCAGGAGG 298
cath-PY<P.yunnanensis> AATCTG---AGGCTGTGACTTGGAGAAATGCTCACTCAAAAGGACGGGGAGTGAAGATCTGTGGA-TTCTACAGCAGGAGG 310
cath-DM<D.melanostictus> AATCTG---AGATTCCTGATTTACCCAGGCTGATTTCAACCTGACCGATGTTGAAGATCTGTGGA-TTCTACAGCAGGAGG 305
cath-NV<N.ventripunctata> AATCTG---AGATATCACTTGGAGAAATGCTCACTCAAAAGGACGGGGAGTGAAGATCTGTGGA-TTCTACAGCAGGAGG 327
BG-CATH37<B.gargarizans> AATCTG---AGATTCCTGATTTACCCAGGCTGATTTCAACCCGAGGATGTTGAAGATCTGTGGA-TTCTACAGCAGGAGG 325
cath-AL<A.loloensis> AATCTG---AAGCAGCTGACT---GATCACTGCTCACTCAAAAGGAGGGGGTGTGTAATTCCTGCTCA-TCAATATCTTCTGAGG 322
cath-OA1<O.andersonii> AAGGAGC---AGATATCCG---GAGGAATGCTCTTCTTCTAGAGGAGGGGGTGTGTAATTCCTGCTCA-TCAATATCTTCTGAGG 326
Tylotoin<T.verrucosus> AATCTGAGTGGACAAACCAACTGAGACAAATGCACTTCAACCTGACAGAGAGTGAAGATCTGTGGA-TTCTACAGCAGGAGG 322
FM-CATH1<F.multistriata> AATCTG---AAGGCCAAGCTTGGAGAAATGCTCACTCAAAAGGACGGGGAGTGAAGATCTGTGGA-TTCTACAGCAGGAGG 307
FM-CATH2<F.multistriata> AATCTG---AAGGCCAAGCTTGGAGAAATGCTCACTCAAAAGGACGGGGAGTGAAGATCTGTGGA-TTCTACAGCAGGAGG 307
AdCath<A.davidianus> AATCTG---AAGGCCAAGCTTGGAGAAATGCTCACTCAAAAGGACGGGGAGTGAAGATCTGTGGA-TTCTACAGCAGGAGG 307

```

(图4, 转接下页)

(图 4, 接上页)

	*	360	*	380	*	400	*	420	*
OL-CATH1<O.livida>	AGGAGGAGGAGACCTCAGAGATTC	GAATCGG	TCAGGCTCACC	GA	ACTCACGGGGCAGCCAT	ATAAAAAAAG	387		
OL-CATH2<O.livida>	AGGATG	TCGAATCGA	TCAGGCTCTG	A	ATTACCTACCAACCCATCC	ATAAAAAAAG	369		
Lf-CATH1<L.fragilis>	GGGAGG	CCTCAGGGACTCTGAATGTG	TCAGGCTCAGCAA	C	ATCCACCATCAACAG	ATATAGGAGA	375		
Lf-CATH2<L.fragilis>	AGGAGG	TCGAATCGG	TCAGGCTCACTGA	A	ATTCAAGATCCGCGGGCCAA	ATAAAAAA	367		
cath-RC1<R.catesbeiana>	AGGATG	TCGAATCGG	TCAGGCTCAACG	A	ATTCACTAGCAAGCTTCCAGCAAAAG	369			
cath-RC2<R.catesbeiana>	AGGATG	TCGAATCGG	TCAGGCTCAACG	A	ATTCACTAGCAAGCTTCCAGCAAAAG	369			
cath-PR1<P.robertingeri>	AGGACG	TCGAATCGG	TCAGGCTCAACG	A	ATTCACTAGCAAGCTTCCAGCAAAAG	345			
cath-PR2<P.robertingeri>	GGGACAC	CATGAAGACTCTGAATGTG	TCAGGCTCAGCAA	C	ATTTCCGGCCAAAGCAGCCACAGTAA	362			
cath-PP<P.puerensis>	AGGAGG	TCGAATCGG	TCAGGCTCTCGG	A	ATTGCGCCCAACAGCCAGTCAAGAT	357			
cath-PY<P.yunnanensis>	AGGACG	TCGAATCGG	TCAGGCTCTCGA	A	ATTCACTAGCAAGCTTCCAGCAAAAG	369			
cath-DM<D.melanostictus>	AGGATCCT	GAGGATATCATGTCTG	TCAGGCTCAACAA	G	AGGTCCATCAAGCCGTCAGCAAGG	393			
cath-NV<N.ventripunctata>	GGGACAC	CATGAAGACTTCGAATGTG	TCAGGCTCAGCAA	C	ATTTCCAGCCACATCCAGGATGA	378			
BG-CATH37<B.gargarizans>	AGGATCCT	GAGGACATATGTGCA	CGAGTCTCAACAA	G	AGGTCTGTCAAGCCGTCAGCAAGG	389			
cath-AL<A.loloensis>	AAACGACCCGGACATCATTGTGTC	CACTCCAGGACCAAGAGGC	ATCGAGAACCTCAA	AGTGAGAA	ATACGGCGTGGC	411			
cath-OA1<O.andersonii>	CAATCAGGAG	AAGGCTGAGCTCAGCTC	CAGCCATGATCCT	CACCCGCA	CGCTCCCTCAAA	TCATCTGA	408		
Tylotoin<T.verrucosus>	TCCTTGAGGATGACGTAATCATGGT	ATTTGTGAT	CGAGTACAGCAA	A	GCCTTCCAGTAAAGAA	CAAGGCAATCA	399		
FM-CATH1<F.multistriata>	AGGACG	TCGAATCGG	TCAGGCTCTCGA	A	ATTCACTAGCAAGCTTCCAGCAAAAG	366			
FM-CATH2<F.multistriata>	AGGACG	TCGAATCGG	TCAGGCTCTCGA	A	ATTCACTAGCAAGCTTCCAGCAAAAG	366			
AdCath<A.davidianus>	-----	AACACATAGAGTAGTGGTCACT	TEAC	A	CTGCAACCCA	AGTAAGTCCAGGGAA	AAAGG	CAAAAAAGCA	380

	*	440	*	460	*	480	*	500	*
OL-CATH1<O.livida>	AAGAAATCTAAAGGTTATCGCT	CAGACCA	GTGATTCAGTAG	CCAAATTT	CTCGGC	GTATTAAACGACAGG	GAGAACAT	---	467
OL-CATH2<O.livida>	ACAAAATCCAA	---	CTTCTCTCAAAG	---	TCGAAACAGCC	CAAATCT	GTCCGCTCCAAAGACCTTAT	GGGTCAAGCAG	447
Lf-CATH1<L.fragilis>	CGCCCTCCCGGGTATTTCT	CTCCAGCA	GTCCGGTCCAGCAG	GCBAATCG	CTCGGC	CCGGCAA	AACATATCTACCT	---	454
Lf-CATH2<L.fragilis>	GGGAAATCTAA	---	CGTCTATCTCAAC	---	TAAAGCAGTAGC	CCGATCT	ATCGGC	---	439
cath-RC1<R.catesbeiana>	AAAAAGTCCAA	---	ATCTTCTCAAAG	---	TCGAAACAGCA	CAAATCT	ATCGGCTCCAGATCCCTAT	GTCT	440
cath-RC2<R.catesbeiana>	AAAAAGTCCGG	---	CTTCTCTCAAAT	---	TCGAAATAGCC	CAAATCT	ACCGCTCCAGGACAAAT	ATCCGGCAGGGAC	446
cath-PR1<P.robertingeri>	CGAAAGTCTAA	---	CTTCTCTCAAAG	---	CGAAGCAGTAGC	CAAATCT	CTCGGC	---	414
cath-PR2<P.robertingeri>	AAAGACTCCAAAGATTA	TTTGTCTAAAC	TCGTTATCAAC	TGCATCT	TCGACCCACAT	CCAAAGACTG	---	432	
cath-PP<P.puerensis>	CGAAAGTCCAA	---	CTIATTTCTCTIAG	---	TCGAAAGCAGCC	GCGATCT	GTCCGC	---	424
cath-PY<P.yunnanensis>	ACAAAGTCCAA	---	CTTTTTTCTCAAAC	---	TAAAGCAGTAGC	GCGATCT	GTCTGC	---	434
cath-DM<D.melanostictus>	AAACCATCCAAAGGGTGGCTCT	CBAAGTGAAGCTA	GAGCGGTATACT	CTIATCTCGG	CAG	---	TCCTACAACTTAAATAG	---	473
cath-NV<N.ventripunctata>	AAGCAATCCAAAGATCATCGCT	TAGCC	TCGTTATCA	AAGTGCAT	CA	TTCACTACGTTT	AAGCGCTG	---	448
BG-CATH37<B.gargarizans>	---	ACCATCCAGGGGAGTCT	CCGGCCCGCGCTA	GAGCGGTATACT	TTATCGGC	AGACCCGTTAA	AAAACAAAACAG	---	470
cath-AL<A.loloensis>	CGAGGTCTGGCAGACGAGGGG	TAGCGGGCCAGAGT	GAGAGAGGAGGAGGGG	GTA	ATCTGGAGCTGGCT	CTTCCATCGC	---	494	
cath-OA1<O.andersonii>	GCAGCCGATCAGACCAAT	CCACCCAGCTCCTCA	AGGCCAAAT	TTATCAACT	CCGGCA	AAAAAAGATGAC	ACGGCTTTCCCTG	---	492
Tylotoin<T.verrucosus>	ACAAAATCTGTCCGGCAGAA	TAAACAAAGCGCTGTG	CAATA	---	---	---	---	441	
FM-CATH1<F.multistriata>	CTGAAAACCAA	---	AGCTTAAACAAC	---	TCGAAACAGCC	CCAAAGT	GTCCGCAATCTCAT	CGGAGGTGTATCA	443
FM-CATH2<F.multistriata>	CTGAAAACCAA	---	AGCTTAAACAAC	---	TCGAAACAGCC	CCAAAGT	GTCCGCAATCTCAT	CGGAGGTGTATCA	443
AdCath<A.davidianus>	CAACGGATATGGCACCA	CAGCA	CAATGCAAGCG	GAAG	CAAAAGTAG	AACGCTCTTTAA	---	444	

	*	520	*	540	*	560	*	580	*	600
OL-CATH1<O.livida>	---	ATATCIACCTTCGGTGTCT	AAAAATGAGCCCGT	GTATCTGAT	CGCACCAGCCGCT	GACCACTGC	CCAGCTTTG	CGCTTATCA	551	
OL-CATH2<O.livida>	TCATCATGGAATTTATCGCG	GTAAATGATACAT	CCCGCCATCAGT	GCAATAAGAC	CCCAATCGCC	AACGGTCACT	CGGT	531		
Lf-CATH1<L.fragilis>	---	TCATC	ACTGTCTAAAGATGG	CAAGAGCCCGGG	ACCTGAGG	ATTCTTTGTG	TGCAIATTTG	CA	531	
Lf-CATH2<L.fragilis>	---	GTGTACTTCCGGC	---	GGATCAATGGCATTT	---	CGTGAAAC	---	CGTA	487	
cath-RC1<R.catesbeiana>	---	ATCCCGTTT	AAATGATAGCTGC	---	---	CGCCGCAACGCT	CCCCCGGT	487		
cath-RC2<R.catesbeiana>	TCATGGTGAACATTTTC	CGCGTATAAATGATACAT	CCCGCCATCAGT	GCAATAACG	AGCCCGCTCGC	AACGCTCCCC	GTG	531		
cath-PR1<P.robertingeri>	---	GTTCATCCACCTCGA	---	GGATCAACGGCATTTTC	CGC	---	TGCTGGGGCGCC	AAA	469	
cath-PR2<P.robertingeri>	---	ATCCCTGACCATCG	CAAGGGCGTCAGCA	---	---	---	GTACACACGTTG	GGGGCA	482	
cath-PP<P.puerensis>	---	TCGTCG	GTA	AAATAGCATAGCCAA	---	---	TATIATCCG	ATTTTGGC	470	
cath-PY<P.yunnanensis>	---	GTCTTAGACCTCAA	---	GGATCAAGATACTTC	---	---	GCTGATCCG	TTCAAA	489	
cath-DM<D.melanostictus>	---	ACCTACCTACCTGAGGG	CAATA	---	---	---	---	485		
cath-NV<N.ventripunctata>	---	ATTTCTGATCAT	CGCCCGGCAATCAGT	---	---	---	GTAACGCA	CGTTG	498	
BG-CATH37<B.gargarizans>	---	ACCTAAGTACAT	GGGTGTAAGCATCT	CGACTCACAGTAGA	ACGAGATCT	GAGATTGAGG	CTTATGCA	AGCACAT	554	
cath-AL<A.loloensis>	---	TGGGTTCGGAAGCCG	AGCAGGCGGTGGCC	CACTATGCTT	AAAGTGTTC	CTATGAT	TGAAGT	TTTTTGTACAT	573	
cath-OA1<O.andersonii>	---	GATGTATCCGGCAGG	ACCCGCAATG	GAGTCACTC	---	---	CGCCCTCGT	CCCAAGTGCAT	560	
Tylotoin<T.verrucosus>	---	ATAAATCAACAT	CCGCTGCAGAAA	AACGCTTCAAT	---	---	CCGATCAT	CGCAATCAG	500	
FM-CATH1<F.multistriata>	---	ATAAATCAACAT	CCGCTGCAGAAA	AACGCTTCAAT	---	---	CCGATCAT	CGCAATCAG	500	
FM-CATH2<F.multistriata>	---	ATAAATCAACAT	CCGCTGCAGAAA	AACGCTTCAAT	---	---	CCGATCAT	CGCAATCAG	500	
AdCath<A.davidianus>	---	---	---	---	---	---	---	---	-	

	*	620	*	640	*	660	*	680	
OL-CATH1<O.livida>	CATCGGCTTATAGCCA	ATCTACTCATGTCATT	---	TCCATG	ACTGTGAC	---	ATCTTGCTTTG	CCACATCC	631
OL-CATH2<O.livida>	ACACCGTGCACCTCT	CTCATCAGACATCT	TTTCTATCAT	GATACAT	TTGAT	---	GTGTAATCT	CATCAGACGAT	606
Lf-CATH1<L.fragilis>	CGTTATCCAA	TAAAAAGTGAAT	CGCAAAAA	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA	586
Lf-CATH2<L.fragilis>	CGGCA	---	AACGCCCTC	---	CAGAGCA	AAATATCTA	---	CCGCTAT	532
cath-RC1<R.catesbeiana>	GCACCGCGCAATCT	CCGCTCATCAGAAAT	ATTTCTCIAT	CTCTGATACAT	TTGTATA	---	CTGTGTGTGT	GAATTTGATCGGATGAT	571
cath-RC2<R.catesbeiana>	GCACCGCGCAATCT	CCGCTCATCAGAAAT	ATTTCTCIAT	CTCTGATACAT	TTGTATA	---	CTGTGTGTGT	GAATTTGATCGGATGAT	615
cath-PR1<P.robertingeri>	ACGGCGGGCAGGGC	---	GACCGCAACG	CTTCCGACCGGGCA	ACTATC	---	ACTGCGGT	TCCAAA	533
cath-PR2<P.robertingeri>	TTCCACCCGAACTTT	---	CTTGTACCT	CTTTGTCAGAT	ACGACGCTT	---	ATGTTCCG	CTCAATTCAGCTGAA	553
cath-PP<P.puerensis>	CTTCAATGCACCTTC	---	CTTACCGCT	AAATATCCCTC	---	---	CCGACGCT	TTTGCA	532
cath-PY<P.yunnanensis>	ACGCAAC	---	AAATGCTT	CCGCTCGGCA	ACATCTGTC	---	---	ATGCAAT	537
cath-DM<D.melanostictus>	---	---	---	---	---	---	---	---	-
cath-NV<N.ventripunctata>	TTCCACCCGAACTTT	---	TTTGTAGCT	CTTTTGTACAT	IACCATGCTTT	---	ATGTTCCG	CTCAATTCAGCTGAA	571
BG-CATH37<B.gargarizans>	TATAAGCTTTACTAGT	TTATTATTATGAGGT	GCGAGTGGC	ACATTTGCC	AACTCC	---	TTACTCT	TCTGACCTCTCCCATCTTCA	639
cath-AL<A.loloensis>	CTGTGTAA	TAAATCGTTCAT	AAAAATCT	CTCTTTTACC	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA	648
cath-OA1<O.andersonii>	CCTTCCCA	ACACCAATTA	ATAGAGTAGC	ACAGTCACT	TCATGCT	---	GATATCC	CAATGTGAATTTACCAGGGAAGT	646
Tylotoin<T.verrucosus>	---	---	---	---	---	---	---	---	-
FM-CATH1<F.multistriata>	ATCCAGAGCAAGGAA	---	ACCGCAAT	TACGTC	CCCCGCACTTCT	TTATAGC	---	AAATATTGTGTG	664
FM-CATH2<F.multistriata>	ATCCAGAGCAAGGAA	---	ACCGCAAT	TACGTC	CCCCGCACTTCT	TTATAGC	---	AAATATTGTGTG	664
AdCath<A.davidianus>	---	---	---	---	---	---	---	---	-

(图 4, 转接下页)

(图 4, 接上页)

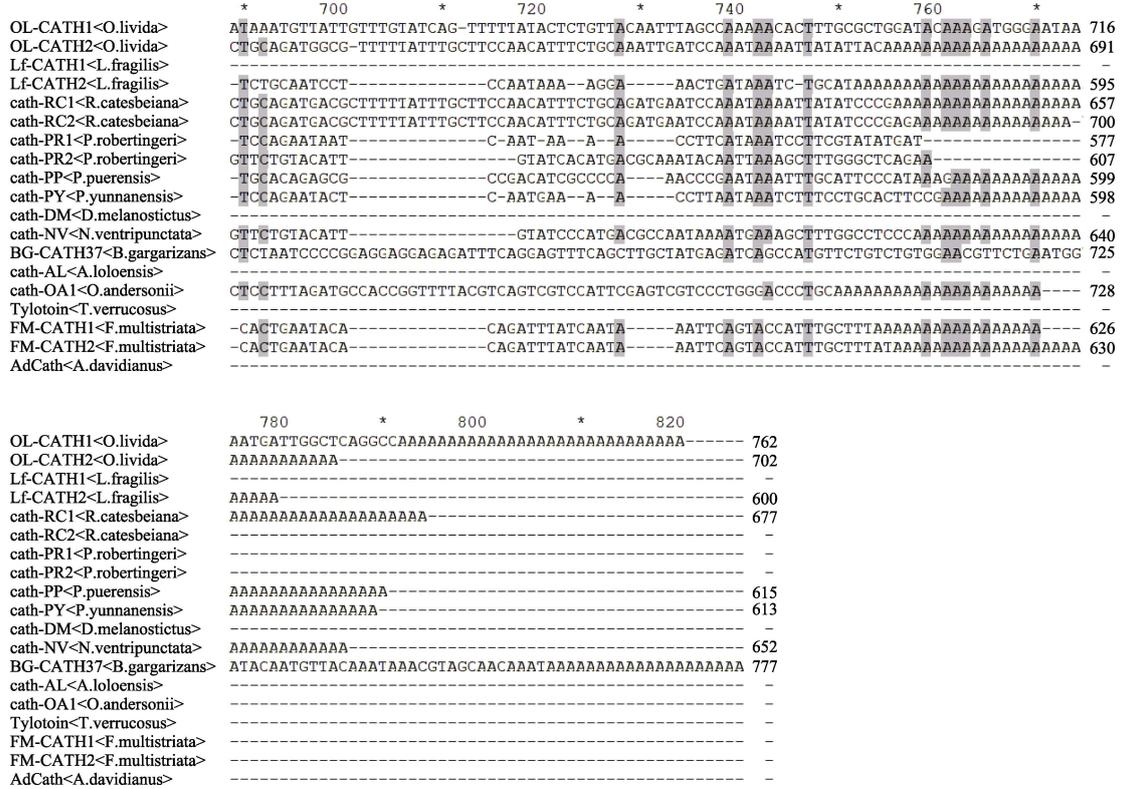


图 4 两栖类动物来源 Cathelicidins 的编码基因多序列比对

Fig. 4 Multiple Sequence Alignment of cDNAs Encoding Cathelicidins from Amphibians

图中棕色区域, 颜色越深表示相似度越高, 黑色底色部分表示相同氨基酸, 灰色底色部分表示相似氨基酸; “-”表示此位置无氨基酸。序列上方星号与数字均标示此处氨基酸在序列中处第几位, 间隔为 10, 交替出现。图右侧数字标示此行最后一位氨基酸在此序列中处于第几位。图左侧内容为抗菌肽名称缩写, 尖括号内为物种学名缩写: O. livida. 大绿臭蛙 *Odorrana livida*; L. fragilis. 脆皮大头蛙 *Limnectes fragilis*; R. catesbeiana. 牛蛙 *Rana catesbeiana*; P. robertingeri. 合江棘蛙 *Paa robertingeri*; P. puerensis. 普洱泛树蛙 *Polypedates puerensis*; P. yunnanensis. 双团棘胸蛙 *Paa yunnanensis*; D. melanostictus. 黑眶蟾蜍 *Duttaphrynus melanostictus*; N. ventripunctata. 腹斑倭蛙 *Nanorana ventripunctata*; B. gargarizans. 中华蟾蜍 *Bufo gargarizans*; A. loloensis. 棕点湍蛙 *Amolops loloensis*; O. andersonii. 云南臭蛙 *Odorrana andersonii*; T. verrucosus 红瘰疣螈 *Tylotriton verrucosus*; F. multistriata. 泽蛙 *Fejervarya multistriata*; A. davidianus. 中国大鲵 *Andrias davidianus*。

In the colored area of the figure, the darker color indicates the higher similarity, the black background indicates the same amino acid, and the gray background indicates the similar amino acid; "-" means there is no amino acid at this position; The asterisk and the number above the sequence indicate the position of the amino acid in the sequence, and the interval is 10, appearing alternately; The number on the right side of the figure indicates where the last amino acid of this line is in the sequence; The left side of the figure is the abbreviated name of the antimicrobial peptide, and the abbreviation of the scientific name of the species is in the angle brackets.

Cathelicidin-PR1、Cathelicidin-PR2、OL-CATH2。 β -折叠型 Cathelicidins 具有反向平行的 β -折叠结构。伸展螺旋型 Cathelicidins, 其分子通常呈现出线性结构, 脯氨酸 Pro 含量一般为 33%~49%, Arg 一般为 13%~33%。例如棕点湍蛙

来源的 Cathelicidin-AL 的二级结构即为伸展螺旋 (Hao et al. 2012)。环状结构型 Cathelicidins, 其分子内含有一对二硫键, 整体呈现环链结构。如腹斑倭蛙来源的 Cathelicidin-NV 结构多呈现为环状结构。

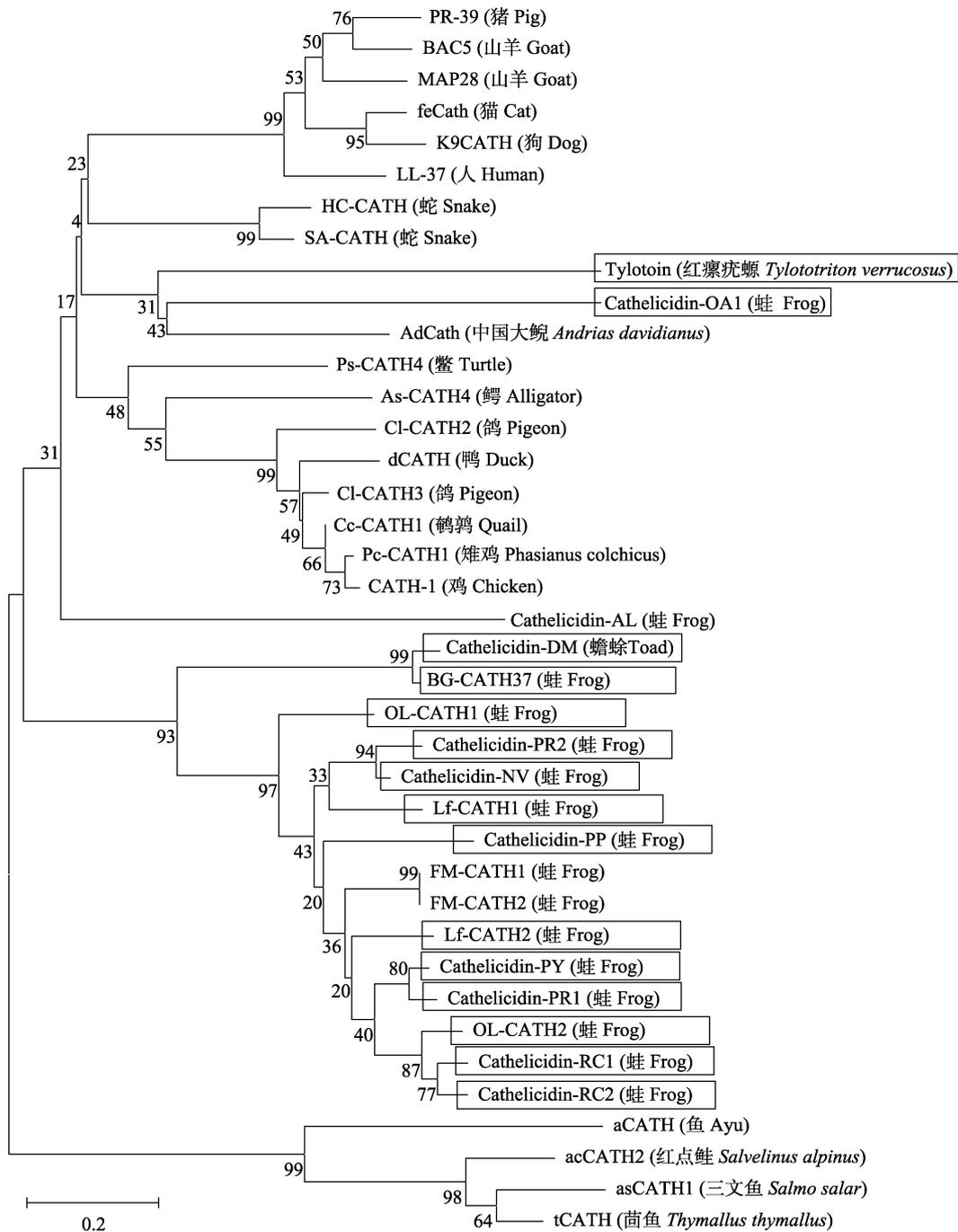


图 5 两栖类与其他动物来源 Cathelicidins 的序列进化树分析

Fig. 5 Sequence phylogenetic tree analysis of cathelicidins from amphibians and other animals

节点处的数值为邻接法构建的系统发育关系的支持率；标尺表示遗传距离；含半胱氨酸的肽用方框进行标记；各分支末端部分为抗菌肽名称，括号内为物种类别。

The value at the node is the support rate of the phylogenetic relationship constructed by the neighbor joining method; The ruler represents the genetic distance; the peptides containing cysteine are marked with boxes; the end of each branch is the name of the antimicrobial peptide and the species category in the brackets.

4 两栖类动物 Cathelicidins 家族抗菌肽的生物学活性

4.1 抗菌活性

4.1.1 α -螺旋型 Cathelicidins 两栖类动物来源的 Cathelicidins 多以 α -螺旋结构为主。研究发现, α -螺旋型的 Cathelicidins 抗菌肽通常对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌及许多耐药菌均有抑制作用, 如肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、有被膜和无被膜大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 等菌株 (Travis et al. 2000)。双团棘胸蛙来源的 Cathelicidin-PY 对除枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) 以外的大部分革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌以及真菌, 包括临床分离的耐药菌株, 都显示出很强的抑菌活性, 对耐氨苄青霉素大肠杆菌 08A852 的最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, 最低抑菌浓度) 为 1.37 $\mu\text{mol/L}$, 对铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 08031205 的最低抑菌浓度为 2.74 $\mu\text{mol/L}$, 对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 08A865 的最低抑菌浓度为 2.74 $\mu\text{mol/L}$, 对测试菌株的最低抑菌浓度范围在 4.65 ~ 37.50 mg/L 之间。Cathelicidin-PY 在 5 倍最低抑菌浓度下, 可以在 10 min 之内杀死所有的大肠杆菌, 其杀菌速度甚至快于第四代喹诺酮类抗菌药物左氧氟沙星 (levofloxacin) (Wei et al. 2013)。棕点湍蛙来源的 Cathelicidin-AL 也具有广谱的抗菌活性, 对金黄色葡萄球菌以及铜绿假单胞菌均具有很强的抗菌活性, 最低抑菌浓度值低至 6.25 mg/L (Hao et al. 2012)。

α -螺旋两栖类动物 Cathelicidins 家族抗菌肽对真菌也具有抑制作用。例如双团棘胸蛙来源的 Cathelicidin-PY 对白色念珠菌 (*Candida albicans*) 和耐氨苄青霉素白色念珠菌株的最低抑菌浓度均为 1.37 $\mu\text{mol/L}$ (Wei et al. 2013), 抑菌效果很好。

本实验室前期研究了大绿臭蛙来源的 OL-CATH2、合江棘蛙来源的 Cathelicidin-PR1、

牛蛙来源的 Cathelicidin-RC1 与泽蛙来源的 FM-CATH1 和 FM-CATH2、脆皮大头蛙来源的 Lf-CATH1 和 Lf-CATH2 的抗菌活性。发现 OL-CATH2 对 8 种受测细菌菌株中的 5 种菌株具有抗菌作用, 最低抑菌浓度范围为 9.38 ~ 75.00 mg/L。相较于革兰氏阳性菌, OL-CATH2 对革兰氏阴性菌有更好的抑制效果, 对幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 的作用效果也较好, 其最低抑菌浓度为 9.38 mg/L (Qi et al. 2018)。Cathelicidin-PR1 对临床分离的耐药菌具有抗菌效果 (Luo et al. 2019)。Cathelicidin-RC1 对大多数被测微生物的最低抑菌浓度范围为 1.43 ~ 22.85 $\mu\text{mol/L}$, 对于某些微生物菌株甚至表现出比美罗培南 (meropenem) 更好的抑菌效果 (Ling et al. 2014)。FM-CATH1 和 FM-CATH2 对实验中 13 种微生物均表现出强而广谱的抗菌活性, 最低抑菌浓度范围为 1.23 ~ 19.87 $\mu\text{mol/L}$ 。此外, 13 种微生物中有 6 种菌株对氨苄青霉素 (ampicillin) 具有抗性, 但 FM-CATH1 和 FM-CATH2 在低浓度下能有效杀死它们, 且其对大肠杆菌 ATCC25922 的杀灭速度更是快于美罗培南 (Wang et al. 2017)。来源于脆皮大头蛙的 Lf-CATH1 和 Lf-CATH2 对多种微生物 (包括标准和临床分离的耐药菌株) 均显示出有效的抗菌活性 (Yu et al. 2013)。

4.1.2 β -折叠型 Cathelicidins 以 β -折叠为主要结构的 Cathelicidins 抗菌肽数量较少, 两栖类动物中只在普洱泛树蛙中发现。普洱泛树蛙来源的 Cathelicidin-PP 表现出对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌的广谱抗菌活性, 对革兰氏阳性菌的最低抑菌浓度为 5.57 $\mu\text{mol/L}$, 对革兰氏阴性菌的最低抑菌浓度在 0.69 ~ 2.78 $\mu\text{mol/L}$ 之间。在测试的 9 种微生物菌株中, 大肠杆菌 ATCC25922 对 Cathelicidin-PP 表现出最高的敏感性, 最低抑菌浓度值为 0.69 $\mu\text{mol/L}$ (Mu et al. 2017)。

4.1.3 延伸螺旋、无规卷曲 Cathelicidins 延伸螺旋类 Cathelicidins 抗菌肽也表现出良好的

抗菌活性, 因其分子内富含 Arg 和 Pro 而呈松散的线状结构, 这类抗菌肽分子对革兰氏阳性菌的抑制效果优于革兰氏阴性菌。例如棕点湍蛙来源的 Cathelicidin-AL, 具有广谱有效的抗微生物活性 (Hao et al. 2012)。中华蟾蜍来源的 BG-CATH29 与 BG-CATH37 其二级结构是无规卷曲, 两者均表现出良好的抑菌效果 (Sun et al. 2015)。黑眶蟾蜍来源的 Cathelicidin-DM 其二级结构主要为无规卷曲, 其对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和某些临床耐药菌株有较好的抑制作用, 如对多株耐药肺炎克雷伯菌的最低抑菌浓度均为 6 mg/L。并且其杀菌速度较快, 在 10 min 内可杀死 60% 以上的粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) ATCC29212 和大肠杆菌 ATCC 35218、80% 的大肠杆菌 ATCC25922 和金黄色葡萄球菌 ATCC25923, 15 min 内即可杀死近乎全部 (98%) 的溶血葡萄球菌 (*Staphylococcus haemolyticus*) (Shi et al. 2020)。

4.2 抗炎活性

越来越多的研究表明, 两栖类动物 Cathelicidins 主要有两种抗炎途径, 即直接中和脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 和抑制炎症通路的激活。核磁滴定试验显示, 双团棘胸蛙来源的 Cathelicidin-PY 具有直接结合 LPS 的能力 (Wei et al. 2013), 浓度为 10 ~ 40 $\mu\text{mol/L}$ 时对脂多糖的中和率可超过 70% (Wang et al. 2020)。也可抑制脂多糖诱导的 toll 样受体 4 (toll-like receptor 4) 炎症信号通路的激活, 从而抑制一氧化氮 (NO) 和细胞因子的分泌, 达到抗炎症的功能 (Wuerth et al. 2011)。普洱泛树蛙来源的 Cathelicidin-PP 通过抑制脂多糖介导的一氧化氮和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 等生成而发挥重要的抗炎功能, 在 20 mg/L 时对脂多糖诱导肿瘤坏死因子- α , 白细胞介素-1 β (Interleukin 1 β , IL-1 β) 和白细胞介素-6 (Interleukin 6, IL-6) 的抑制率分别为 52.5%、42.7% 和 55.6%, 并以剂量依赖的方式引起脂多糖的部分中和。也可

抑制脂多糖诱导的细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK)、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK)、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38MAPK, p38) 和核因子 κB 65 (nuclear factor kappa-B 65, NF- κB 65), 特别是 c-Jun 氨基末端激酶的磷酸化。在 20 mg/L 的浓度下, Cathelicidin-PP 可分别抑制脂多糖诱导引起的 66.9% 磷酸化的细胞外信号调节激酶 1 (p-extracellular signal-regulated kinase1, p-ERK1)、50.3% 磷酸化的细胞外信号调节激酶 2 (p-extracellular signal-regulated kinase2, p-ERK2)、100% 磷酸化氨基末端激酶 1 (P-c-Jun N-terminal kinase, P-JNK1)、100% 磷酸化氨基末端激酶 2 (P-c-Jun N-terminal kinase2, P-JNK2)、47.8% 磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (P-p38MAPK, P-p38) 和 31.8% 磷酸化 p56 丝裂原活化蛋白激酶 (P-p56MAPK, P-p56) 的表达 (Mu et al. 2017)。中国大鲵来源的 rAdCath 可以剂量依赖性方式结合脂多糖 (Yang et al. 2017)。通过免疫组化分析得出云南臭蛙来源的 Cathelicidin-OA1 通过促进肿瘤坏死因子- α 的释放, 使得大量巨噬细胞聚集至创伤处, 引起转化生长因子- β 1 (transforming growth factor β 1, TGF- β 1) 的释放, 从而促进创伤修复 (Cao et al. 2018)。

本实验室前期研究发现, 大绿臭蛙来源的 OL-CATH2 在 10 mg/L 的低浓度下, 可显著抑制脂多糖诱导的几种促炎因子的转录和蛋白质合成恶性胸膜间皮瘤 (malignant pleural mesothelioma, MPM) 中的细胞因子 (Qi et al. 2018), 泽蛙来源的 FM-CATH1 和 FM-CATH2 在 10 mg/L 的浓度下均可显著抑制脂多糖诱导的肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-1 β 和白细胞介素-6 的基因转录及蛋白质产生 (Wang et al. 2017)。

4.3 创伤修复活性

皮肤作为生物体与外界接触的第一道屏障, 能有效抵御外界对生物体的刺激。然而烧伤、皮肤病等发生之后, 屏障会被打破, 从而

导致伤口形成。伤口的快速愈合是其恢复组织功能、保证正常生存的重要过程。伤口表面常有微生物形成的生物膜，由于抗菌肽可有效地抑制和清除生物膜，因此也利于促进伤口愈合。相较于哺乳动物，两栖动物的伤口修复期通常比较短，实验发现蝾螈断肢创口处的细胞可以反向变为“幼年”细胞，形成具有芽基能力的细胞群，最终完成残体的再生，具有良好的创伤修复能力 (Kragl et al. 2009, Bazaz et al. 2015)。例如通过对红瘰疣螈来源的 Tylotoxin 进行细胞划伤及小鼠 (kunming mice) 背部皮肤切除等实验，发现其可以促进创伤部位血管内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 及人皮肤成纤维细胞 (human skin fibroblast, HSF) 的增殖，也具有促进人类永生角质形成细胞 (human immortalized keratinocytes, HaCat) 增殖或某些细胞迁移的能力 (Mu et al. 2014)。在云南臭蛙中发现的 Cathelicidin-OA1 无论是在细胞水平还是在小鼠动物模型中，均表现出较好的促进创伤愈合的活性 (Cao et al. 2018)。体内实验显示，双团棘胸蛙来源的 Cathelicidin-PY 在浓度为 10~40 $\mu\text{mol/L}$ 时，可改善模型小鼠的肝损伤程度并显著提高其存活率 (Wang et al. 2020)。研究者也发现，腹斑倭蛙来源的 Cathelicidin-NV 在体外和动物模型上均能够加快小鼠全层皮肤伤口愈合，促进人皮肤成纤维细胞与人类永生角质形成细胞的增殖和某些细胞的迁移。在小鼠皮肤创伤感染模型中，接受 Cathelicidin-DM 处理的小鼠组比对照组和庆大霉素 (gentamycin) 组的伤口愈合得更快 (Shi et al. 2020)。

因此，可将两栖类动物 Cathelicidins 家族抗菌肽作为新型创伤修复类药物研发的重点对象之一，相较其他来源的 Cathelicidins 具有更好的研究前景，非常值得关注。

4.4 抗氧化活性

生物体时刻都在产生自由基，而自由基的积累会引发许多疾病。所以，减少自由基的生

成及清除积累的自由基，是维持生物体健康的良好举措。两栖类动物的皮肤裸露，较其他生物而言更易受到外界紫外线的刺激，产生大量自由基，但是自然界中两栖类动物却能正常生存繁衍，因此我们合理推测，其体内应该有抵御这些不利因素的活性分子。在云南臭蛙中发现的 Cathelicidin-OA1 没有表现出抗菌、抗病毒等活性，却体现出抗氧化活性，当其浓度为 32 $\mu\text{mol/L}$ 时，2, 2'-联氮-双 3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (2, 2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS) 自由基的清除率为 90%，在浓度为 128 $\mu\text{mol/L}$ 时，1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基的清除率约为 90% (Cao et al. 2018)。由此可知，两栖类动物 Cathelicidins 有开发为抗氧化药物或应用到化妆品中的巨大潜力。

本实验室前期研究发现，脆皮大头蛙来源的 Lf-CATH1 具有清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基的能力，在浓度分别为 80 mg/L 与 160 mg/L 时，对 1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基的清除率可达到 23.96%、57.79%，且其抗氧化能力可能与肽浓度呈线性关系 (广慧娟 2013)。

4.5 抗生物膜活性

生物膜 (biofilm) 也称为生物被膜，是指附着于有生命或无生命物体表面被细菌胞外大分子包裹的有组织的细菌群体。大肠杆菌及金黄色葡萄球菌等菌株均具有形成生物膜的能力。研究发现某些医疗器械表面也有生物膜存在，如手术刀刃或植入性医疗器械等，这无疑是个巨大的隐患 (Pletzer et al. 2016)。并且发现一些常见慢性病和持续性感染疾病通常与病原菌形成生物膜有关，生物膜的存在降低了病原菌对宿主免疫细胞和抗菌药物的敏感性，使其成为“漏网之鱼” (Vyas et al. 2016)。而目前可用的多数抗生素不能高效穿过生物膜，且其最低抑菌浓度与最低杀菌浓度 (minimal bactericidal concentration, MBC) 值均较高，可能导致体内毒性，对治疗生物膜引起的疾病无效。研究发现许多抗菌肽具有抑制、清除生

物膜的活性。

本实验室前期研究发现，泽蛙来源的 FM-CATH1 和 FM-CATH2 在 16 mg/L 的浓度下分别抑制 62.2% 和 65.4% 的细菌生物膜形成 (Wang et al. 2017)。

4.6 其他活性

通过研究发现，两栖类动物 Cathelicidins 的溶血活性与细胞毒性普遍较低，相较于两栖类动物其他家族抗菌肽和其他动物来源的 Cathelicidins 具有很大差异。因此两栖类动物来源 Cathelicidins 更适合作为新药研发的前体。例如，双团棘胸蛙中发现的 Cathelicidin-PY 在浓度 12.5、25 和 50 mg/L 时，分别会诱导 2.5%、3.5% 和 5.5% 人类红细胞溶血，显示出其对人类血细胞可忽略的溶血作用，且细胞毒性较低 (Wei et al. 2013)。在棕点湍蛙来源的 Cathelicidin-AL 对人红细胞的溶血活性检测中发现，即使在高浓度作用时也没有表现出明显的溶血活性 (Hao et al. 2012)。黑眶蟾蜍来源的 Cathelicidin-DM 对人红细胞溶血性也非常低 (Shi et al. 2020)。本实验室前期研究发现，牛蛙来源的 Cathelicidin-RC1 具有低溶血活性，在肽浓度为 100 mg/L 和 200 mg/L 时，仅分别诱导 0.2% 和 2.6% 的人红细胞溶血。细胞毒性也较低，并且其盐稳定性较高 (Ling et al. 2014)。脆皮大头蛙中发现的 Lf-CATHs 在浓度高达 0.1 $\mu\text{mol/L}$ (大于 25 倍的最低抑菌浓度) 时，Lf-CATH1 和 Lf-CATH2 分别仅诱导 9.5% 和 13.5% 的人红细胞溶血 (Yu et al. 2013)。

5 抗菌作用机制

抗菌肽的作用靶点包括微生物膜和胞内靶点，大多数抗菌肽以微生物膜为靶点。以膜为作用靶点的抗菌肽主要是通过改变膜渗透压，破坏膜结构，使通透性增加，进而杀死微生物 (Beutler 2004, Savini et al. 2020)。以胞内成分为靶点的抗菌肽则可通过抑制核酸合成或蛋白质合成、折叠或细胞壁的形成等方式来杀灭微生物 (Otvos et al. 2000, Patrzykat et al. 2002,

Jenssen et al. 2006)。例如猪 (*Sus domestica*) 来源的富含脯氨酸的 Cathelicidins 家族抗菌肽 PR-39，其抗菌机制为非膜破坏型，可特异性的与 DnaK 蛋白结合，抑制 DnaK 的生物功能，最终导致细菌的死亡 (徐恒卫等 2004)。

多数目前已发现的两栖类动物 Cathelicidins 的作用靶点为微生物膜，基本不用通过识别特异性受体进入病原微生物内部，也不作用于胞内靶标，因此不易使微生物产生耐药性，被认为是抗生素的替代品和增效剂，用于解决日益严重的细菌耐药性问题 (Shi et al. 2020)。通过分析已发现的两栖类动物 Cathelicidins 的成熟肽序列，不难发现多数带正电荷，而病原微生物的膜多带负电，推测这一特征将有利于增加抗菌肽与膜的相互作用。

目前发现的抗菌肽以微生物膜为作用靶点的模型主要为“桶板”模型和“地毯”模型两种 (王晨等 2017)。

以“桶板”模型为作用机制的抗菌肽一般结构主要为 α -螺旋或 β -折叠，且疏水性较高。首先，肽的疏水部分与膜外的亲水部分相结合，随后肽的亲水端插入膜内与疏水部分相结合，使膜出现离子通道，造成膜内外离子浓度失衡，而杀死细菌。以此为作用模式的抗菌肽通常主要由疏水氨基酸组成，不论脂膜带何种电荷，肽分子都可以与之结合，对正常的哺乳动物细胞也有毒性 (Shai 1999)。

研究发现，以“地毯”模型为作用机制的抗菌肽首先聚集并结合到微生物膜外围，但不插入膜中，当达到一定浓度时，大量的抗菌肽会形成一个“地毯”，使膜上脂质排列混乱，造成膜塌陷，从而导致内容物丢失使得病原微生物死亡 (Hale et al. 2007)。

通过扫描电镜发现，经双团棘胸蛙来源的 Cathelicidin-PY 处理过的细菌质膜和细胞内部都有破裂，细菌细胞内容物大量外泄，从而杀死细菌 (Wei et al. 2013)。观察棕点湍蛙来源的 Cathelicidin-AL 处理后细菌的透射电镜结果，发现细菌形态发生显著变化，膜与壁之间

的界面模糊, 出现大量囊泡状结构, 因此推测是通过破坏壁与膜来杀死细菌的 (Hao et al. 2012)。普洱泛树蛙来源的 Cathelicidin-PP 通过破坏细菌细胞膜的完整性杀死细菌 (Mu et al. 2017)。中国大鲵来源的 AdCath 会破坏细菌的细胞膜, 导致细胞膜完整性的丧失 (Yang et al. 2017)。本实验室前期发现, 牛蛙来源的 Cathelicidin-RC1 是通过破坏微生物膜来杀灭微生物的 (Ling et al. 2014)。泽蛙来源的 FM-CATH1 与 FM-CATH2 在 5 倍的最低抑菌浓度下孵育 2 h 后, 对大肠杆菌 ATCC25922 分别诱导 62.8% 和 61.3% 的钙黄绿素 (Calcein-AM) 释放, 结果表明其能显著破坏微生物膜的完整性 (Wang et al. 2017)。

6 应用前景

两栖类动物属于一类具有巨大利用价值的生物资源, 它们具有药用、食用、美学等多种科研及利用价值。并且中国的两栖类动物资源丰富, 特有种类多 (赖仞等 2002), 约有 325 个种 (亚种), 其中, 2/3 是特有种类 (Clarke 1997)。两栖类动物 Cathelicidins 家族抗菌肽除具有高效广谱的抗微生物活性外, 还具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、作为效应分子参与免疫系统调节、细胞趋化、有些还具有中和内毒素的活性, 以及清除、抑制生物膜等重要活性 (Wuerth et al. 2011)。与其他动物来源的 Cathelicidins 相比, 两栖类动物 Cathelicidins 家族抗菌肽具有独特性, 如特殊的酶作用, 成熟肽区保守的 Cys 与二硫键, 强修复合活性等。并且两栖类动物中的抗菌肽含量远远高于哺乳类, 被称为天然多肽的自然资源库。研究两栖类动物 Cathelicidins 家族抗菌肽对动物免疫学和新药研发都具有重要意义。由于环境变化等原因可能导致许多两栖类动物灭绝, 这使得大量潜在的多功能抗菌肽未得到充分的研究, 因此对两栖类动物 Cathelicidins 家族抗菌肽的研究迫在眉睫。

参 考 文 献

- Anastasia N, Hancock R E W. 2009. The roles of Cathelicidin LL-37 in immune defences and novel clinical applications. *Current Opinion in Hematology*, 16(1): 41–47.
- Auvynet C, Rosenstein Y. 2009. Multifunctional host defense peptides: antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity. *FEBS Journal*, 276(22): 6497–6508.
- Bazaz M R, Mashreghi M, Shahri N M, et al. 2015. Evaluation of antimicrobial and healing activities of frog skin on guinea pigs wounds. *Jundishapur Journal of Microbical*, 8(8): e21218.
- Beutler B. 2004. Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*, 40(12): 845–859.
- Bletz M C, Kelly M, Sabino P J, et al. 2018. Disruption of skin microbicidal contributes to salamander disease. *Proceedings. Archives of Biological Sciences*, 285(1885): 20180758.
- Cao X Q, Wang Y, Wu C Y, et al. 2018. Author Correction: Cathelicidin-OA1, a novel antioxidant peptide identified from an amphibian, accelerates skin wound healing. *Scientific Reports*, 8(1): 943.
- Choi K Y, Chow L N Y, Mookherjee N. 2012. Cationic host defence peptides: multifaceted role in immune modulation and inflammation. *Journal of Innate Immunity*, 4(4): 361–370.
- Clarke B T. 1997. The natural history of amphibian skin secretions, their normal function and potential medical applications. *Biological Reviews*, 72 (3): 365–379.
- Deng H Q, Chen C, Xiao N, et al. 2017. Prokaryotic expression of antimicrobial peptide CATH PR1–2 from the skin of *Paa robertingeri* in *Escherichia coli*. *Asian Herpetological Research*, 8(4): 275–283.
- Hale J D F, Hancock R E W. 2007. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Review of Antiinfective Therapy*, 5(6): 951–959.
- Hao X, Yang H L, Wei L, et al. 2012. Amphibian Cathelicidin fills the evolutionary gap of Cathelicidin in vertebrate. *Amino Acids*, 2(43): 677–685
- Jenssen H, Pamela H, Hancock R E W. 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbical Reviews*, 19(3): 491–511.

- Kahlenberg J M, Kaplan M J. 2013. Little peptide, big effects: the role of LL-37 in inflammation and autoimmune disease. *Immunology*, 191(10): 4895–4901.
- Kragl M, Knapp D, Nacu E, et al. 2009. Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature*, 460(7251): 60–69.
- Lai Y P, Gallo R. 2009. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in Immunology*, 30(3): 131–141.
- Ling G Y, Gao J X, Zhang S M, et al. 2014. Cathelicidins from the bullfrog *Rana catesbeiana* provides novel template for peptide antibiotic design. *Public Library of Science*, 9(3): e93216.
- Liu H H, Sun Q, Jiang Y T, et al. 2019. In-depth proteomic analysis of *Boleophthalmus pectinirostris* skin mucus. *Journal of Proteomic*, 200: 74–89.
- Luo Q H, Deng H Q, Yin M G, et al. 2019. Novel Cathelicidin antimicrobial Peptides from *Paa robertingeri*. *Annual Research & Review in Biology*, 32(4): 1–10.
- Mu L X, Tang J, Liu H, et al. 2014. A potential wound-healing-promoting peptide from salamander skin. *FASEB Journal*, 28(9): 3919–3929.
- Mu L X, Zhou L, Yang J J, et al. 2017. The first identified Cathelicidin from tree frogs possesses anti-inflammatory and partial LPS neutralization activities. *Amino Acids*, 49(9): 1571–1585.
- Otvos L, Insug O, Rogers M E, et al. 2000. Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry*, 39(46): 14150–14159.
- Patrzykat A, Friedrich C L, Zhang L, et al. 2002. Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(3): 605–614.
- Pletzer D, Coleman S R, Hancock R E. 2016. Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare. *Current Opinion in Microbicidal*, 33: 35–40.
- Qi R H, Chen Y, Guo Z L, et al. 2018. Identification and characterization of two novel Cathelicidins from the frog *Odorrana livida*. *Zoological Research*, 40(2): 94–101.
- Ramanathan B, Davis E G, Ross C R, et al. 2002. Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. *Microbicidal and Infection*, 4(3): 361–372.
- Savini F, Loffredo M R, Troiano C, et al. 2020. Binding of an antimicrobial peptide to bacterial cells: Interaction with different species, strains and cellular components. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1862(8): 183291.
- Shai Y. 1999. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipids bilayer membranes by α helical antimicrobial and cell non selective membrane lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1672(1/2): 55–70.
- Shi Y Q, Li C, Wang M, et al. 2020. Cathelicidin-DM is an antimicrobial Peptide from *Duttaphrynus melanostictus* and Has Wound-Healing Therapeutic Potential. *American Chemical Society omega*, 5(16): 9301–9310.
- Shinnar A E, Butler K L, Park H J. 2003. Cathelicidin family of antimicrobial peptides: proteolytic processing and protease resistance. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 31(6): 425–436.
- Sun T Y, Zhan B, Gao Y Y. 2015. A novel Cathelicidin from *Bufo bufo gargarizans* Cantor showed specific activity to its habitat bacteria. *Gene*, 571(2): 172–177.
- Travis S M, Anderson N N, Forsyth W R, et al. 2000. Bactericidal activity of mammalian cathelicidin-derived peptides. *Infection and Immunity*, 68(5): 2748–55.
- Turner J, Cho Y, Dinh N N, et al. 1998. Activities of LL-37, a Cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother*, 42(9): 2206–2214.
- Vyas K S, Wong L K. 2016. Detection of biofilm in wounds as an early indicator for risk for tissue infection and wound chronicity? *Annals of Plastic Surgery*, 76(1): 127.
- Wang A L, Chen Y, Yu H N, et al. 2017. Novel Cathelicidins with Potent antimicrobial, Biofilm Inhibitory, and Anti-inflammatory Activities from the Frog *Fejervarya multistriata*. *Asian Herpetological Research*, 8(3): 199–212.
- Wang Y P, Hong J, Liu X H, et al. 2008. Snake Cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotics. *Public Library of Science*, 3(3): e3217.
- Wang Y, Hong J, Liu X, et al. 2008. Snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotics. *PLoS One*,

- 3(9): e3217.
- Wang Y, Huang X P, Gan J H. 2020. Preliminary study of antimicrobial peptide cathelicidin-PY therapy in mice with acute liver failure. *Chinese Journal of Hepatology*, 28(3): 254–258.
- Wei L, Yang J J, He X Q, et al. 2013. Structure and Function of A Potent Lipopolysaccharide-binding antimicrobial and Anti-inflammatory Peptide. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(9): 3546–3556.
- Wu J, Yang J, Wang X F, et al. 2018. A frog cathelicidin peptide effectively promotes cutaneous wound healing in mice. *Biochemical Journal*, 475(17): 2785–2799.
- Wuerth K, Hancock R E W. 2011. New insights into Cathelicidin modulation of adaptive immunity. *European Journal of Immunology*, 41(10): 2817–2819.
- Yang D, Chertov O, Oppenheim J J. 2001. The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity. *Cellular and molecular life sciences Cmls*, 58(7): 978–989.
- Yang H, Lu B Y, Zhou D D, et al. 2017. Identification of the first Cathelicidin gene from skin of Chinese giant salamanders *Andrias davidianus* with its potent antimicrobial activity. *Developmental and Comparative Immunology*, 77: 141–149.
- Yu H N, Cai S S, Gao J X, et al. 2013. Identification and polymorphism discovery of the Cathelicidins, Lf-CATHs in ranid amphibian (*Limnonectes fragilis*). *The FEBS Journal*, 280(23): 6022–6032.
- Zanetti M, Gennaro R, Romeo D. 1995. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS letters*, 374(1): 1–5.
- Zanetti M, Gennaro R, Scocchi M. 2000. Structure and biology of Cathelicidins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 479: 203–218.
- Zanetti M. 2005. The role of Cathelicidins in the innate host defenses of mammals. *Current Issues in Molecular Biology*, 7(2): 179–196.
- 广慧娟, 厉政, 王义鹏, 等. 2012. Cathelicidins 家族抗菌肽研究进展. *动物学研究*, 33(5): 523–526.
- 广慧娟. 2013. 脆皮大头蛙 Cathelicidins 基因克隆、表达及结构与功能分析. 大连: 大连理工大学硕士学位论文.
- 郝雪. 2011. 棕点湍蛙抗菌肽 Cathelicidin-AL 的分离纯化、基因克隆及抗菌活力分析. 南京: 南京农业大学硕士学位论文.
- 赖仞, 刘衡, 赵宇, 等. 2002. 两栖类动物皮肤活性物质的利用兼论中国两栖类资源开发的策略. *动物学研究*, (1): 65–70.
- 王晨, 冯兰, 于海宁, 等. 2017. Cathelicidins 结构与功能的关系及其分子设计研究进展. *生物工程学报*, 33(1): 27–35.
- 王永东. 2007. 抗菌肽 LL-37 的研究进展. *国际免疫学杂志*, (1): 47–51.
- 徐恒卫, 孙兰, 刘景生. 2004. 富含脯氨酸的抗菌肽研究进展. *中国药理学通报*, (7): 735–740.