

# 蛙类皮肤分泌物中的抗菌肽和抗癌肽

徐强 华跃进\* 徐步进 刘新

(浙江大学原子核农业科学研究所 生物物理国家重点学科 农业部核农学重点开放实验室 杭州 310029)

**摘要:**蛙类的皮肤分泌物中包括了种类繁多、功能复杂的生理活性物质。本文从抗菌肽的杀菌机理出发,综述了蛙类的皮肤分泌物近年来的最新研究进展,重点介绍了抗菌肽结构和功能的关系,并报告了抗癌肽的最新研究进展以及蛙类活性肽在临床上的应用前景。

**关键词:**蛙类;抗菌肽;抗癌肽

**中图分类号:**Q516 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2002)02-73-04

## Antibacterial and Anticancer Peptides in Batrachia Skin Secretion

XU Qiang HUA Yue-Jin XU Bu-Jin LIU Xin

(Institute of Nuclear-Agricultural Science, Zhejiang University Hangzhou 310029, China)

**Abstract:**The skin secretions of Batrachia contain many bioactive substances, including neuropeptides, toxins, opioids, hormones, antimicrobial and antifungal agents. The recent research progress in skin secretions of Batrachia, especially the action mechanisms and the relationship between the structure and function of antibacterial peptides, is reviewed in this paper. The potential application of these peptides in clinics and pharmaceutics is suggested.

**Key words:**Batrachia; Antibacterial peptides; Anticancer peptides

蛙类是两栖纲中形态比较特化的一个类群,体宽而短,由头、躯干和四肢三部分构成。它们分布广泛,除南极外全球均有分布,以温差小而湿度大的热带、亚热带为多<sup>[1]</sup>。蛙类皮肤裸露、潮湿,这无疑给微生物提供了一个极好的生存环境,但在长期的自然选择过程中,它们逐渐形成了防御机制,即由背部及腹部皮肤分泌分泌物来抵御有害环境因子的侵袭。分泌物的主要成分是多肽,包含神经肽、毒素、麻醉剂、激素、抗微生物和抗真菌剂等<sup>[2,3]</sup>。本文重点阐述抗菌肽的结构和功能的关系,并概述抗癌肽的最新研究进展。

### 1 皮肤分泌物的研究概况

我国古代就已经对蛙形目蟾蜍科动物的分泌物进行利用,据《本草纲目》记载,蟾蜍耳后腺及皮肤的分泌物即蟾酥,味甘、辛,性温,有毒。主治:疗毒、恶肿、疮毒、喉痹、齿痛和破伤风等<sup>[4]</sup>。但国内至今对蟾蜍分泌物缺少系统的研究,对蟾酥中的有效成分的结构和组成也未作深入的探讨。赖仞等从云南的大蹼铃蟾

(*Bombina maxima*)的皮肤分泌物中提取了一种抗菌肽MSP-VII,有较强的抗菌活性,有一定的溶血活性;测得分子量为2647 D,含26个氨基酸,但它的具体的氨基酸序列尚不清楚<sup>[5]</sup>。

国外对蛙类分泌物中生理活性肽的研究有40多年的历史,涉及500多种蛙类。研究发现蛙类含有种类繁多的多肽,特别是在非洲爪蟾属(*Xenopus*)和 *Phyllomedusa* 属的蛙类多肽的种类较多<sup>[6]</sup>。Zasloff从非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)皮肤上发现了爪蟾抗菌肽Magainin<sup>[7]</sup>,人们开始认识到脊椎动物的抗菌活性。近来,澳大利亚的学者对澳洲本地的蛙科动物进行了较深入的研究,他们从树蛙 *Litoria chloris* 身上分离得到10种多肽,从 *L. xanthomera* 和 *L. genimaculata* 身上各分离得到6种多肽,从蓝色山树蛙(*L. citropa*)身上分离得到17种多肽。

\* 通讯作者, E-mail: yjhua@zju.edu.cn;

第一作者介绍 徐强,男,29岁,助研,硕士;研究方向:生理活性肽的结构和功能;E-mail: qxul8@yahoo.com.cn。

收稿日期:2001-03-03,修回日期:2001-12-12

此外树蛙 *L. splendida*、铃蛙 *L. aurea*、*L. raniformis* 也是他们研究的主要材料。他们测得了其中多种多肽的氨基酸序列,并对抗菌肽和抗瘤肽的结构和功能作了较为详细的报告<sup>[8-16]</sup>。

## 2 抗菌肽的结构和功能

目前发现的蛙类抗菌肽家族很多。报道较多的有 Magainin 家族、Bombinin 家族、Bombinin-like 家族、Brevinin 家族等<sup>[6,7,17-19]</sup>。Magainin 家族是一类广谱抗菌肽,对于格兰氏阴性、阳性细菌、真菌、酵母以及原生生物都有抗生肽活性。Bombinin 家族抗菌肽也有很强的抗菌活性,它与 Magainin 家族抗菌肽的主要区别在于:它有很强的溶血活性,而 Magainin 家族没有。而 Gibson 等从 *Bombina orientalis* 的皮肤分泌物中分离得到的 Bombinin-like 家族抗菌肽,有抗菌活力,但不具有溶血性<sup>[17]</sup>。可见,不同种的蛙类之间分泌的抗菌肽差异较大。近年来,从澳洲本地的蛙类皮肤分泌物中提取到的抗菌肽有:Caerin 家族、Citropin 家族、Maculatin 家族、Uperin 家族等,都有一定的抗菌活力<sup>[8-16]</sup>。Caerin 1 家族是从几种树蛙皮肤上分离得到的具有广谱抗菌活力的一组活性肽,对它们的结构和功能研究得较为清楚。

如表 1 所示:Caerin 1 家族的多肽均发生了翻译后的修饰,即多肽的羧基端都已酰胺化。核磁共振(NMR)

表 1 Caerin 1 家族的氨基酸序列<sup>[8,10,12,14]</sup>

Peptide	Amino-acid sequence
Caerin 1.1	GLLSVLGSAKHLPHVVPVIAEHL-NH <sub>2</sub>
Caerin 1.2	GLLGVLSVAKHLPHVVPVIAEHL-NH <sub>2</sub>
Caerin 1.3	GLLSVLGSVAQHVLPHVVPVIAEHL-NH <sub>2</sub>
Caerin 1.4	GLLSSLSSVAKHLPHVVPVIAEHL-NH <sub>2</sub>
Caerin 1.5	GLLSVLGSVVKHVPVVPVIAEHL-NH <sub>2</sub>
Caerin 1.6	GLFSVLGAVAKHLPHVVPVIAEKL-NH <sub>2</sub>
Caerin 1.7	GLFKVLGSVAKHLPHVVPVIAEKL-NH <sub>2</sub>
Caerin 1.8	GLFKVLGSVAKHLPHVVPVIAEKL-NH <sub>2</sub>
Caerin 1.9	GLFGVLGSVAKHLPHVVPVIAEKL-NH <sub>2</sub>

研究发现:Caerin 1.1 中有两个螺旋,第 1 个螺旋是从第 2 位的 L 到第 11 位的 K,第 2 个是从第 17 位的 V 到第 24 位的 H。连接这两个螺旋的是一段多变的铰合区,其中第 15 位的 Pro 残基直接导致了在肽的中间区域不能形成螺旋<sup>[14]</sup>。在 Caerin 1 家族中,肽链上有 2 个 Pro 残基对活性是必须的,任何 1 个或 2 个都被 G 替代,都将直接导致多肽活力的下降<sup>[14]</sup>。此外,无论从 N 端或 C 端降解 2 个氨基酸残基都会导致 Caerin 1 家族的多肽抗菌活性的丧失<sup>[20,21]</sup>。如树蛙 *L. xanthomera* 的皮肤分泌物中含有一种内肽酶,能将其分泌的 Caerin 1.6 和 Caerin 1.7 从 N 端开始切去 2 个氨基酸残基,从而使之失去抗菌活力<sup>[8]</sup>。

表 2 Caerin 1 家族的抗菌力的比较<sup>[8,10,12,14]</sup>

Organism	MIC( $\mu\text{g/mL}$ )								
	Caerin 1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8	1.9
<i>Bacillus cereus</i>	50	50	50	50	50	>100	>100	50	>100
<i>Escherichia coli</i>	>100	>100	>100	50	100	50	>100	100	-
<i>Leuconostoc lactis</i>	1.5	25	25	12	3	3	3	-	25
<i>Listeria innocua</i>	25	100	100	100	50	50	50	25	
<i>Micrococcus luteus</i>	12	>100	1.5	0.4	12	25	12	6	12
<i>Pasteurella multocida</i>	25	>100	25	25	25	25	25	50	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	3~12	>100	100	100	25	6~12	12~50	6~12	12
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12	50	100	25	25	12	50	12	25
<i>Streptococcus uberis</i>	12	>100	100	100	30	25	50	25	25

\* MIC 值:最小抑制浓度

从表 2 可见,在 Caerin 1 家族的多肽中,Caerin 1.1 显示了最强的广谱抗菌能力;而 Caerin 1.4 和 Caerin 1.5 只在某些特殊种的微生物上,如:藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、乳明串珠菌(*Leuconostoc lactis*),显示出比 Caerin 1.1 高的抗性。引入或替换 G 残基会降低抗菌力,这可能与影响螺旋的形成有关。如 Caerin 1.1 第 4 位 S 被替换成 G(Caerin 1.2 和 Caerin 1.9),Caerin 1.1 第 7 位 G 被替换成 S(如:Caerin 1.4),除了对藤黄微球菌

的抗菌力有提高外,对其余几种微生物的抗性均下降。另外,对于 Caerin 1.1 中的疏水氨基酸残基的替换对抗菌力的影响较小。

## 3 抗菌肽杀菌的机理

从目前得到的蛙类抗菌肽看来,大多数蛙类抗菌肽含有的氨基酸残基数目都在 21 到 27 个之间,且具有形成两亲的  $\alpha$  螺旋结构的倾向。抗菌肽的氨基酸残基

的替换,只要是有利于形成两亲 $\alpha$ 螺旋结构的,一般都会提高抗菌肽的抗菌活性<sup>[6]</sup>。且它们大多都是碱性多肽,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<sup>[22,23]</sup>。Jacob等认为抗菌肽的杀菌机理是这些抗菌肽依赖两亲的 $\alpha$ 螺旋结构,作用于细菌细胞膜的层状排列的脂类双分子层,使细菌细胞膜破裂,并最终导致细菌细胞壁的溶解<sup>[24]</sup>。

由D-氨基酸构成的对映体一般与天然存在的抗菌肽具有相同的活性,这说明抗菌肽的作用机理与酶或受体等蛋白因子无关,它们主要是作用于膜脂质的基质,通过物理化学机制作用于细胞骨架,使膜的通透性增大,形成贯通膜的离子通道;但是其详细的分子学作用机制仍不清楚。另外,像Magainin家族这样的抗菌肽,它们是如何识别微生物膜和动物细胞膜也不十分清楚。

#### 4 抗癌肽的结构和功能

对蛙类抗癌肽的报道尚不多见。Soballe等观察到抗菌肽Magainin也显示出一些抗癌活力<sup>[25]</sup>。从*L. Aurea*和*L. raniformis*两种蛙的身上提取得到抗癌肽Aurein家族<sup>[16]</sup>,同时有抗菌活力。

表3 Aurein家族的氨基酸序列<sup>[16]</sup>

Aurein	Amino-acid sequence
1.2	GLFDIHKKIAESF-NH <sub>2</sub>
2.5	GLFDIVKKVVGAFGSL-NH <sub>2</sub>
2.6	GLFDIAKKVIGVIGSL-NH <sub>2</sub>
3.1	GLFDIVKKIAGHIAGSI-NH <sub>2</sub>
3.2	GLFDIVKKIAGHIASSI-NH <sub>2</sub>
3.3	GLFDIVKKIAGHIVSSI-NH <sub>2</sub>

如表3所示:Aurein家族的一级结构已经准确测定,核磁共振(NMR)研究发现:有抗癌活力的Aurein家族成员大多也具有两亲的 $\alpha$ 螺旋结构,抗癌机理与抗菌肽的机理类似,也是通过侵入并破坏癌细胞的细胞膜,从而杀死癌细胞。

由表4可见,Aurein家族都显示了广谱抗癌的活力,大约对人体90%的癌细胞都有中等程度抗性。使癌细胞半致死的量是 $10^{-5} \sim 10^{-4}$  mol/L ( $1 \times 10^{-5}$  mol/L相当于15  $\mu$ g/ml)。Aurein家族多肽之间抗癌活力的差异不太大。

Roack等<sup>[16]</sup>将抗癌肽Aurein 1.2和3.2分别作用于人体红细胞和癌细胞,发现当浓度达到100  $\mu$ g/ml时,已经能够杀死癌细胞,但对红细胞没有明显的影响。只有

当Aurein 1.2和3.2的浓度达到1 mg/ml时,红细胞才被完全溶解。这可能是因为癌细胞膜表面的带负电荷磷脂的量是正常细胞的8倍,从而更有利于抗癌肽选择作用于癌细胞膜,并使之溶解。

表4 Aurein家族的抗癌活力比较<sup>[16]</sup>

Cancer	LC <sub>50</sub> (10 <sup>-6</sup> mol/L)					
	Aurein 1.2	Aurein 2.5	Aurein 2.6	Aurein 3.1	Aurein 3.2	Aurein 3.3
Leukaemia	4~5	4~5	4.5	4	5	4~5
Lung	5	5	5	4	5	5
Colon	5	4~5	4~5	5	4~5	5
CNS	5	5	5	4~5	5	5
Melanoma	5	4~5	5	4~5	5	5
Ovarian	5	5	5	4~5	5	5
Renal	5	5	5	4~5	5	5
Prostate	5	5	5	5	5	5
Breast	5	5	5	4~5	5	-

LC<sub>50</sub>值:杀死50%癌细胞的最小摩尔浓度,在表中以10<sup>-6</sup>的n表示

#### 5 研究的意义和展望

蛙类皮肤分泌物中包含了种类繁多、功能复杂的活性物质,多肽是其中的主要成分。蛙类活性肽无论在种类上,还是数量上,在它们皮肤中的分布都是惊人的,哺乳类在这方面是无法与之相比的。更有意义的是,在蛙类皮肤中发现的活性多肽,很多都能在哺乳类的神经内分泌细胞和肽能神经元中找到它们的对应物。它们在临床方面的应用越来越受到关注。此外,由于抗菌肽的作用机理与青霉素等抗生素不同,后者是通过阻断大分子的生物合成来发挥作用的,目前已产生一些抗药的菌株。而抗菌肽的独特作用机理使病原菌不易对其产生抗药性。因此,很可能成为新药的来源。

#### 参 考 文 献

- [1] 董聿茂主编. 浙江动物志两栖纲及爬行纲卷. 杭州:浙江科学技术出版社,1990. 43~47.
- [2] Lazarus L H, Attila M. The toad, ugly and venomous, wears yet a precious jewel in his skin. *Prog Neurobiol*, 1993, **41**: 473~507.
- [3] Erspamer V. Bioactive Secretions of the Amphibian Integument: Amphibian Biology. Australia: The Integument Press, 1994. 178~350.
- [4] 李时珍. 本草纲目. 北京:中国国际广播出版社, 1994. 2536~2542.

- [5] 赖仞, 叶文娟, 冉永禄等. 大蹼铃蟾皮肤分泌液中抗菌活性肽的分离纯化及其性质. 动物学研究, 1998, 19(4):257~262.
- [6] Bevins C L, Zasloff M. Peptides from frog skin. *Annual Review of Biochemistry*, 1990, 59:395~414.
- [7] 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(15):5 449~5 453.
- [8] Steinborner S T, Currie G J, Bowie J H *et al.* New antibiotic caerin 1 peptides from the skin secretion of the Australian tree frog *Litoria chloris*, comparison of the activities of the caerin 1 peptides from the genus *Litoria*. *Journal of Peptide Research*, 1998, 51: 121~126.
- [9] Wegener K L, Wabnitz P A, Carver J A. Host defense peptides from the skin glands of the Australian blue mountains tree-frog *Litoria citropa*. *European Journal of Biochemistry*, 1999, 265: 627~637.
- [10] Wabnitz P A, Steinborner S T, Currie G J. New caerin 1 antibiotic peptides from the skin secretion of the Australian tree frog *Litoria chloris*, part 2. sequence determination using electrospray mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1998, 12: 53~56.
- [11] Wabnitz P A, Bowie J H. The citropin peptides from the skin glands of the Australian blue mountains tree frog *Litoria citropa*. part 2: sequence determination using electrospray mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1999, 13: 1 724~1 732.
- [12] Rozek T, Waugh R J, Steinborner S T. The maculatin peptides from the skin glands of the tree frog *Litoria genimaculata*: A comparison of the structures and antibacterial activities of maculatin 1.1 and caerin 1.1. *Journal of Peptides Science*, 1998, 4: 111~115.
- [13] Chia B C S, Carver J A, Mulhern T D *et al.* Maculatin 1.1, an anti-microbial peptide from the Australian tree frog, *Litoria genimaculata* solution structure and biological activity. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267:1 894~1 908.
- [14] Wong H, Bowie J H, Carver J A. The solution structure and activity of caerin 1.1, an antimicrobial peptide from the Australian green tree frog, *Litoria splendida*. *European Journal of Biochemistry*, 1997, 247: 545~557.
- [15] Chia B C S, Carver J A, Mulhern T D *et al.* The solution structure of uperin 3.6, an antibiotic peptide from the granular dorsal glands of the Australian toadlet, *Uperoleia mjobergii*. *Journal of Peptide Research*, 1999, 54: 137~145.
- [16] Roaek T, Wegener K L, Bowie J H. The antibiotic and anti-cancer active aurein peptides from the Australian bell frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis*. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267: 5 330~5 341.
- [17] Gibson B W, Tang D Z, Mandrell R *et al.* Bombinin-like peptides with antimicrobial activity from skin secretions of the Asian toad, *Bombina orientalis*. *J Biol Chem*, 1991, 266(34):23 103~23 111.
- [18] Moore K S, Bevins C L, Brasseur M M *et al.* Antimicrobial peptides in the stomach of *Xenopus laevis*. *J Biol Chem*, 1991:266(29):19 851~19 857.
- [19] Giovannini M G, Poulter L, Gibson B W *et al.* Biosynthesis and degradation of peptides derived from *Xenopus laevis* prohormones. *Biochem J*, 1987, 243(1):113~120.
- [20] Stone D J M, Waugh R J, Bowie J H *et al.* Peptides from Australian frogs, the structures of the caerins and caeridins from *Litoria caerulea*. *J Chem Res (s)*, 1993, 138(M):910~936.
- [21] Steinborner S T, Waugh R J, Bowie J H *et al.* New caerin antibacterial peptides from the skin glands of the tree frog *Litoria xanthomer*. *Journal of Peptide Science*, 1997, 3: 181~185.
- [22] Andren D, Aschauer H, Kreil G. Solid-phase synthesis of PY-La and isolation of its natural counterpart, PGLa [PYLa-(4-24)], from skin secretion of *Xenopus laevis*. *European Journal of Biochemistry*, 1985, 149: 531~535.
- [23] Hans V, Westerhoff, Davor J. Magainins and the disruption of membrane-linked free energy transduction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 6 597~6 601.
- [24] Jacob J, Zasloff M. Antimicrobial peptides. In: Boman H G, Marsh J, Goode J A eds. *Ciba Symposium 186*. Chichester: Wiley, 1994. 197~223.
- [25] Soballe P W, Maloy W L, Myrnga M L *et al.* Experimental local therapy of human melanoma with lytic magainin peptides. *Int J Cancer*, 1995, 60:280~284.