

# 两栖动物皮肤结构及皮肤抗菌肽<sup>\*</sup>

刘炯宇 江建平<sup>\*\*</sup> 谢 锋 郑中华

(中国科学院成都生物研究所 成都 610041)

**摘要:** 两栖动物皮肤在自然进化过程中形成了防御病原微生物的三套防御系统,相应地具有特定结构。皮肤抗菌肽是其中先天性防御系统的主要组成部分。本文概述了两栖动物皮肤结构特点以及皮肤抗菌肽在国内外的最新研究进展,重点介绍了两栖动物皮肤腺体和蛙皮抗菌肽的种类、分子结构、抗菌机理、基因表达调控及 cDNA 编码特点以及基因工程等。以期系统认识和了解这些方面的研究与进展。

**关键词:** 两栖动物;皮肤结构;皮肤抗菌肽

**中图分类号:** Q516 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2004)01-112-05

## Structure and Antimicrobial Peptides of Amphibian Skin

LIU Jiong-Yu JIANG Jian-Ping XIE Feng ZHENG Zhong-Hua

(*Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China*)

**Abstract:** Amphibian skin has some unique characteristics, and has developed three sets of defense systems against pathogenic microbes, one of which is the innate immune system mainly composed of the antimicrobial peptides. This review describes the structure of amphibian skin and antimicrobial peptides from the skin including their molecular structure, antimicrobial mechanism, gene expression regulation and cDNA encoding characteristics, as well as genetic engineering.

**Key words:** Amphibian; Skin structure; Antimicrobial peptides

在脊椎动物演化过程中,两栖动物是由水生到陆生的过渡型<sup>[1]</sup>,其中很多物种具有食用或药用等价值<sup>[2]</sup>,因此是重要的生物资源。两栖动物皮肤在自然进化过程中形成了防御病原微生物的三套防御系统,相应地具有与这些防御系统相适应的特定结构。皮肤抗菌肽是其中先天防御系统的主要组成部分。两栖动物皮肤抗菌肽具有高效、广谱、不易产生耐药性等特点<sup>[3-5]</sup>。这使其在耐抗生素病原菌株大量涌现的今天有望成为新一代的临床抗菌药物<sup>[6,7]</sup>,并成为当前的研究热点。本文将对两栖动物皮肤结构及皮肤抗菌肽的研究情况进行概述,以期系统认识和了解这方面的研究进展。

### 1 两栖动物皮肤结构

两栖动物皮肤主要包括两大层,即表皮(epidermis)和真皮(dermis)。成体皮肤腺主要有两种:粘液腺(mucus gland)和颗粒腺(granular gland)。颗粒腺又叫毒

腺(poison or venom gland)、浆液腺(serous gland)或浆液颗粒腺(serous granular gland)。此外,近年在叶泡蛙属(*Phyllomedusa*)部分物种的皮肤里还观察到第三种腺体,即脂腺(lipid gland)。

粘液腺:外形比颗粒腺小,数量则远较颗粒腺多,大概是颗粒腺数目的十倍,周身体表都有分布,尤其背部分布很密。粘液腺分泌出清澈粘液,覆盖在身体表面形成一层湿润的薄膜,具有防御、繁殖、保湿、皮肤呼吸、温度调节、pH调节等作用,粘液的主要成分是糖胺聚糖和蛋白聚糖<sup>[8]</sup>。粘液腺的显微观察表明,上皮细胞呈立方形,充满无定形细碎颗粒,细胞之间的连接是

<sup>\*</sup> 国家自然科学基金项目(No. 30000018),中科院生命科学特别基金项目(STZ-01-19),四川省科技厅应用基础项目;

<sup>\*\*</sup> 联系人, E-mail: jiangjp@cib.ac.cn;

第一作者简介 刘炯宇,男,29岁,硕士研究生;主要从事两栖爬行动物多样性及其活性物质研究。

收稿日期:2003-02-15,修回日期:2003-11-10

颗粒。粘液腺的分泌机制属于局泌(merocrine)。

脂腺:在石蜡切片中无法分辨出此类腺体,而在冰冻切片中此类腺体对苏丹Ⅳ染色呈强阳性,说明脂质含量很高,因而被称为脂腺。其大小介于粘液腺和颗粒腺之间,腺体腔中含有许多大小不一的颗粒。显微研究表明这些颗粒中有许多横向薄层小页。一般认为,脂腺的分泌机制属于局泌<sup>[9]</sup>。

颗粒腺:形体较大,在体表分布不均匀,尤其在头部、肩部、背部、尾部分布较多。颗粒腺在局部聚集形成特殊的腺体结构<sup>[10,11]</sup>。颗粒腺上皮细胞之间无明显的界限,细胞之间也没有桥粒等连接,因而一般认为颗粒腺上皮细胞为合胞体(syncytium)。显微观察表明,这些颗粒有多种形状,如双色叶泡蛙(*P. bicolor*)的颗粒为圆形,而非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)的颗粒为椭圆形<sup>[9]</sup>。

颗粒腺分为两种类型:即Ⅰ型和Ⅱ型。Ⅰ型的内质网不发达,刺激(注射去甲肾上腺素或电击)能引起大量分泌;Ⅱ型的内质网发达,刺激对分泌没有显著影响<sup>[12]</sup>。颗粒腺分泌的活性肽分为两大类,即抗菌肽(antimicrobial peptide)和药理活性肽(pharmacologically active peptide)。颗粒腺的分泌机制属于全泌(holocrine)。

## 2 两栖动物皮肤抗菌肽

两栖动物皮肤裸露和湿润的特性有益于微生物的侵袭,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三套防御机制:①物理屏障,粘液腺分泌大量糖蛋白和蛋白聚糖形成“多肽网”(polypeptide mesh)<sup>[13]</sup>,包裹于皮肤外表面从而构成一道天然屏障,阻碍病原菌的侵入;②获得性免疫系统,两栖动物皮肤中含有抗体 IgG<sup>[14]</sup>;③先天免疫系统<sup>[6,14,15]</sup>,主要由大量的抗菌肽构成。

**2.1 抗菌肽的发现与分离** 在无尾两栖动物中,人们很早就发现其皮肤中含有大量活性物质。1970年,Csordas等在研究欧洲铃蟾皮肤分泌物中的向细胞性物质(cytotropic substances)时发现了第一个具有溶血作用的蛙皮抗菌肽 Bombinin<sup>[16]</sup>;而直到1987年,Zaslloff从非洲爪蟾的皮肤分泌物中提取出了蛙皮抗菌肽 Magainins族,人们才开始重视对此类肽的研究<sup>[17,18]</sup>。据不完全统计,目前已经从无尾两栖动物8个属约40多种的皮肤中提取出了抗菌肽,并测定了序列(中国林蛙暂无序列报道)(表1)。这8个属是铃蟾属(*Bombina*)、肛褶蛙属(*Kassina*)、雨滨蛙属(*Litoria*)、叶泡蛙属

(*Phyllomedusa*)、多指节蟾属(*Pseudis*)、蛙属(*Rana*)、耳腺蟾属(*Uperoleia*)和爪蟾属(*Xenopus*)。其中中国有五个种,即大蹼铃蟾(*B. maxima*)、东方铃蟾(*B. orientalis*)、黑斑蛙(*R. nigromaculata*)、粗皮蛙(*R. rugosa*)和中国林蛙(*R. chensiensis*)。

在有尾两栖动物中,几乎没有皮肤抗菌肽的研究报道。Swendsen等<sup>[13]</sup>在一篇会议文献中阐述了苍白蝶螈(*Desmognathus ochrophaeus*)皮肤分泌物的抗菌效果试验,结论是它的皮肤分泌物仅仅是一个抗菌的物理屏障。赖切等<sup>[19]</sup>报道红瘰疣螈(*Tylotriton verrucosus*)皮肤分泌物具有广谱抗菌活性,但未见报道其有效成分。作者的研究发现山溪鲵(*Batrachuperus pinchonii*)的皮肤分泌物也具有广谱抗菌活性,尤其对枯草杆菌有较强的抗性,进一步提纯工作正在进行中。

**2.2 抗菌肽的种类** 按分子结构可以将蛙皮抗菌肽分为两大类:①不含半胱氨酸且为线形 $\alpha$ -螺旋的肽,如 Magainin-2;②分子中具有一个二硫键的肽,如 Brevinin-1ARa;此外,在异叶泡蛙(*P. distincta*)的皮肤分泌物中还发现了一种特殊的异二聚体抗菌肽 Distinctin,其分子组成为两条肽链通过二硫键连接在一起<sup>[20]</sup>(表1)。

**2.3 蛙皮抗菌肽的分子结构** 从表1可知,蛙皮抗菌肽链一般由11个氨基酸残基(如 Tigemin-1)到47个氨基酸残基(如 Palustrin-3a)构成,除 Distinctin 为两条肽链外,其它的蛙皮抗菌肽分子都是一条肽链。有些肽的个别氨基酸为D-氨基酸;有些肽在C端有酰胺化修饰;部分蛙皮抗菌肽含有两个半胱氨酸残基,形成含一个二硫键的分子,除 Tigemin-1 分子的二硫键包含9个氨基酸残基, Japomicin-2 分子的二硫键包含8个氨基酸残基外,其余蛙皮抗菌肽分子的二硫键都只包含7个氨基酸残基。几乎所有的蛙皮抗菌肽分子都含有较多的亮氨酸和异亮氨酸残基,所以是疏水肽;同时也含有一些精氨酸和赖氨酸残基,因而又是阳离子肽。绝大多数肽分子在水溶液中为无规则卷曲构象,在亲脂性溶液(如50%的三氟乙醇溶液)中或接触到平面脂双层时,多数氨基酸残基形成两亲 $\alpha$ -螺旋<sup>[4,24,28]</sup>。两亲 $\alpha$ -螺旋可以用 $\alpha$ -螺旋轮来表示。图1是作者利用 ANTHEPROT 5.0 软件(下载地址 <http://antheprot-pbil.ibcp.fr/>)对 Magainin-2 分子绘制的 $\alpha$ -螺旋轮。在此轮边缘环绕的氨基酸残基形成两个面,即亲水面和疏水面,亲水面由极性氨基酸和带正电荷氨基酸组成,疏水面由非极性氨基酸组成。

表 1 代表性蛙皮抗菌肽的氨基酸序列

抗菌肽名称	种	氨基酸序列	资料来源
Bombinin H3	欧洲铃蟾 <i>Bombina variegata</i>	II * GPVLGMVGSALGGLKKI-CONH2	[6]
Brevinin-1ARa	隙穴蛙 <i>Rana areolata</i>	FLPLVRVAAKILPSVFCISKRC	[21]
Brevinin-2E	食用蛙 <i>Rana esculenta</i>	GIMDTLKNLAKTAGKGALQSLNKAACKLSGQC	[14]
Brevinin-2Ei	食用蛙 <i>Rana esculenta</i>	GILSTIKDFAIKAGKGAAGLLEMASCKLSGQC	[22]
Dermadistinctin K	异叶泡蛙 <i>Phyllomedusa distincta</i>	GLWSKIKAAAGKEAAKAAKAAAGKAALNAVSEAV	[23]
Distinctin	异叶泡蛙 <i>Phyllomedusa distincta</i>	ENREVPFGFTALIKTLRCKII 链 1 NLVSGLIEARKYLEQLHRKLKNCKV 链 2	[20]
Japonicin-2	日本林蛙 <i>Rana japonica</i>	FGLPMLSILPKALCILLKRKC	[4]
Magainin-2/PGS	非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	[24]
Maximin H1	大蹼铃蟾 <i>Bombina maxima</i>	ILGPVISTIGGVLLGGLKNL-CONH2	[25]
Nigrocin 1	黑斑蛙 <i>Rana nigromaculata</i>	GLLDSIKGMAISAGKGALQNLKVASCKLDKTC	[26]
Palustrin-3a	泽鱼蛙 <i>Rana palustris</i>	IFPKIIGKIKTGIIVNGIKSLVKGVGMKVFKAGLNNIGTGCNEDEC	[4]
Temporin A	欧洲林蛙 <i>Rana temporaria</i>	FLPLIGRVLSGLL-CONH2	[27]
Tigermin-1	南亚虎纹蛙 <i>Rana tigerina</i>	FCTMPIPRCY-CONH2	[4]
XT-1	热带爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>	GFLGPLLKLAAKGVAKVIPHLPSRQQ	[3]

\* 表示左边的那个氨基酸是 D-氨基酸

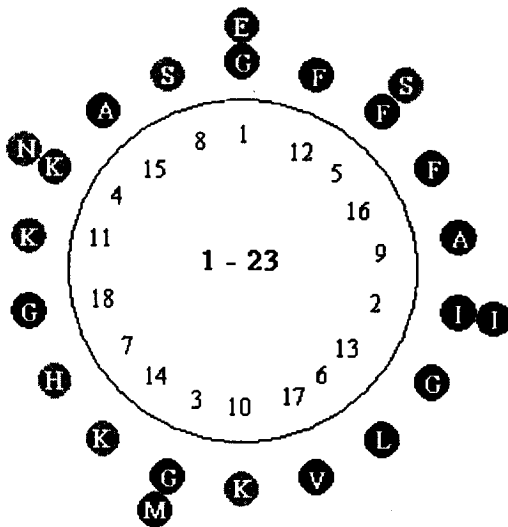


图 1 Magainin-2(序列为 GIGKFLHSAKKFG-KAFVGEIMNS)的  $\alpha$ -螺旋结构

小圈代表氨基酸残基(1~23 共 23 个残基), 轮缘对应的数字为其相应的序列顺序, 字母为所代表的氨基酸残基的标准简写, 浅色面为亲水面, 深色面为疏水面

2.4 抗菌机理 Oren 等<sup>[29]</sup>总结出了两种作用机理: ① 栅桶模型(Barrel-stave model): 肽分子在膜上形成通道, 导致病原微生物氧化磷酸化解偶联而死亡; ② 毯式模型(Carpet-like model): 肽分子聚集在膜外面, 与膜脂作用, 改变其曲率, 逐步包裹膜, 使之成碎片脱离, 最后导致膜崩解。多篇有关抗菌肽的综述对此已有详细阐述<sup>[18, 30-32]</sup>。

两种模型究竟哪种正确, 还是二者兼有, 目前尚无

定论。无论哪种机理, 正电荷对于蛙皮抗菌肽的抗菌作用都非常重要, 例如, Temporin-1Ja(ILPLVGNLLNDLL-CONH2)与其它 Temporin-1 族的抗菌肽分子相比, 主要就是第 11 位的赖氨酸残基被天冬氨酸残基所取代而成为阴离子肽, 试验结果几乎无抗菌活性<sup>[4]</sup>; 从大蹼铃蟾 cDNA 库中筛选到的阴离子抗菌肽 maximin H5(ILGPVLGLVSDTLDDVLGIL-CONH2)也仅具有有限的抗菌活性<sup>[33]</sup>。

抗菌肽对哺乳动物正常细胞一般无损伤<sup>[28, 34]</sup>, 但是大多数蛙皮抗菌肽在高浓度下甚至少数的蛙皮抗菌肽在低浓度下有溶血作用, 因而对哺乳动物正常细胞也有一定毒性。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变强<sup>[24]</sup>。

至于蛙皮抗菌肽是否还有另外的分子类型及另外的作用机理还有待进一步研究, 最近的研究<sup>[26]</sup>表明: 有可能蛙皮抗菌肽作用于细菌细胞膜的同时也和细菌细胞内部目标分子(如 DNA 或 RNA)作用, 从而影响细菌的代谢。

2.5 基因表达调控及 cDNA 编码特点 Simmaco 等<sup>[35]</sup>用糖皮质激素(glucocorticoid, GC)处理(涂抹表皮或注射)食用蛙(*R. esculenta*), 发现抗菌肽 Esculentin 基因的表达被抑制。说明蛙皮抗菌肽基因的表达调控很可能与人和昆虫的许多与免疫相关的基因表达调控一样, 都是受 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ Bs(食用蛙的为 I $\kappa$ B $\alpha$ )机制控制的。具体地说: NF- $\kappa$ B 是一种重要的转录因子, 结合于蛙皮抗菌肽基因启动子区, 促使其转录; 而 I $\kappa$ B $\alpha$  能与 NF- $\kappa$ B 紧密结合阻止后者进入细胞核, 从而抑制基因表达。GC

能够促进 LcBs 的表达,因而间接抑制了蛙皮抗菌肽基因的表达<sup>[6,14]</sup>。抗菌肽基因还能被昆虫的 Rel 因子激活,也说明先天免疫的调节机制从昆虫到脊椎动物是高度保守的<sup>[26]</sup>。对蛙皮抗菌肽的 cDNA 研究表明<sup>[17]</sup>:许多蛙皮抗菌肽基因翻译后的产物是以大分子前体的形式存在,即在同一条前体链上可能同时含有抗菌肽和药理活性肽;同一种蛙皮肽在同一条前体链上可能有多个拷贝。由于成熟蛙皮肽的氨基酸残基有的是 D-氨基酸,有的是修饰过的氨基酸,因此可以推断,从初始翻译产物到成熟多肽,中间必然经历了蛋白内切酶剪切、羧基酰化酶酰化、酪氨酸硫酸化酶硫酸化、D-氨基酸异构酶异构化等修饰过程。有些相关酶已经分离出来。对这方面的研究还需要更进一步地开展。

**2.6 蛙皮抗菌肽的基因工程** 由于化学合成大于 20 个氨基酸残基的蛙皮抗菌肽显然很不经济,因此现在已经发展了重组 DNA 技术来获得大量的蛙皮抗菌肽。但表达产物要抑制细菌生长,并且高浓度下对真核细胞也有一定毒性,所以直接在原核或者真核表达体系中表达蛙皮抗菌肽是不可行的。目前大多采用的方法是:将蛙皮抗菌肽基因先融合到其它蛋白基因中表达成融合蛋白,再用化学法或者酶法切下目的肽。已有几个成功表达蛙皮抗菌肽的报道,如:蛙皮抗菌肽 Magainin 和 Esculentin-1 都能采用将蛙皮抗菌肽融合在表达蛋白质的 C 端来获得,如果表达产物是包涵体形式则更为有效<sup>[6]</sup>。

### 3 结 语

脂腺的发现为两栖动物皮肤结构研究提出了一些新问题:除了叶泡蛙属,在其它两栖动物皮肤中是否存在脂腺;如果有,其数量和比例又是多少,是否在两栖动物皮肤中还存在现有染色方法无法分辨出的其它腺体。两栖动物皮肤抗菌肽具有分子量小、水溶性好、抗原性低等特点;不但能够抗细菌,而且能够抗真菌、抗原虫、抗肿瘤、抗病毒,还能够杀死哺乳动物的精子<sup>[4, 25]</sup>。基于这些特性,可以开发临床应用的抗细菌、抗真菌、抗癌、抗病毒药以及天然避孕药。抗菌肽对膜具有特异的亲和性,因此可以将只具膜亲和作用的抗菌肽衍生物和药物结合,以便该药物能精确地作用于靶部位<sup>[26]</sup>。Rollins-Smith 等<sup>[36]</sup>发现两栖动物种群衰退与其皮肤抗菌肽有关,此研究正引起越来越多的保护生物学家的注意。两栖动物的皮肤结构特性及其皮肤抗菌肽氨基酸残基组成与相应基因结构还可为相关类群的系统与进化生物学研究提供重要信息。目前 Conlon<sup>[7]</sup>等正在开展这方面的研究。抗菌肽在提高植

物的抗菌能力方面也有良好的应用前景, Li 等<sup>[37]</sup>将 Magainin 类似物 Myp30 转基因到烟草,明显提高了植株的抗菌能力。因此,系统开展两栖动物皮肤结构及皮肤抗菌肽的分离纯化、分子结构、作用机理、基因结构及生物工程等方面的研究工作不仅具有重要理论意义,也有广阔的应用前景。

### 参 考 文 献

- [1] Duellman W E, Trueb L. *Biology of Amphibians*. New York: McGraw-Hill Book Company, 1986.
- [2] 叶昌媛, 费梁, 胡淑琴. 中国珍稀及经济两栖动物. 成都: 四川科学技术出版社, 1993.
- [3] Mohamed F A, Soto A, Knoop F C, et al. Antimicrobial peptides isolated from skin secretions of the diploid frog, *Xenopus tropicalis* (Pipidae). *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, **1550**(1): 81 ~ 89.
- [4] Issacson T, Soto A, Iwamuro S, et al. Antimicrobial peptides with atypical structural feature from the skin of the Japanese brown frog *Rana japonica*. *Peptides*, 2002, **23**(3): 419 ~ 425.
- [5] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 2002, **415**(6870): 389 ~ 395.
- [6] Simmaco M, Mignogna G, Barra D. Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? *Biopolymers*, 1998, **47**(6): 435 ~ 450.
- [7] Conlon J M, Kolodziejek J, Nowotny N. Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics*, In Press, Uncorrected Proof, Available online 28 September 2003.
- [8] Toledo R C, Jared C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comp Biochem Physiol*, 1995, **111A**(1): 1 ~ 29.
- [9] Lacombe C, Carmen C D, Dunia I. Peptide secretion in the cutaneous glands of south American tree frog *Phyllomedusa bicolor*: an ultrastructural study. *European Journal of Cell Biology*, 2000, **79**: 631 ~ 641.
- [10] 陆宇燕, 李丕鹏. 我国几种有尾两栖动物部分器官的机能形态学研究. *四川动物*, 1999, **18**(1): 15 ~ 19.
- [11] Zug G R, Vitt L J, Caldwell J P. *Herpetology* (second edition). New York: Academic Press, 2001.
- [12] Delfino G, Nosi D, Giachi F. Secretory granule-cytoplasm relationships in serous glands of anurans: ultrastructural evidence and possible functional role. *Toxicon*, 2001, **39**(8): 1161 ~ 1171.
- [13] Swendsen C L, Sphepard D. A study of antimicrobial effects of

- mountain dusky salamander mucus. Jon Haafjord: Nat Sci Seminar Abstracts, 1998.
- [14] Barra D, Simmaco M, Boman H G. Gene-encoded peptide antibiotics and innate immunity. Do 'animalcules' have defence budgets? *FEBS Letters*, 1998, **430**(1 ~ 2): 130 ~ 134.
- [15] Hancock R E W, Chapple D S. Peptide antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999, **43**(6): 1317 ~ 1323.
- [16] Mor A, Amiche M, Nicolas P. Synthesis, structure, synthesis, and activity of dermaseptin b, a novel vertebrate defensive peptide from frog skin: relationship with adenoregulin. *Biochemistry*, 1994, **33**(21): 6642 ~ 6650.
- [17] 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.
- [18] 徐强, 华跃进, 徐步进等. 蛙类皮肤分泌物中的抗菌肽和抗癌肽. *动物学杂志*, 2002, **37**(2): 73 ~ 76.
- [19] 赖切, 赵宇, 杨东明等. 六种常见两栖类动物皮肤分泌物的生物活性比较. *动物学研究*, 2002, **23**(2): 113 ~ 119.
- [20] Batista C V F, Scalonib A, Rigden D J, et al. A novel heterodimeric antimicrobial peptide from the tree-frog *Phyllomedusa distincta*. *FEBS Letters*, 2001, **494**(1 ~ 2): 85 ~ 89.
- [21] Mohamed F A, Lips K R, Knoop F C, et al. Antimicrobial peptides and protease inhibitors in the skin secretions of the crawfish frog, *Rana areolata*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, **1601**(1): 55 ~ 63.
- [22] Mohamed F A, Knoop F C, Vaudry H, et al. Characterization of novel antimicrobial peptides from the skins of frogs of the *Rana esculenta* complex. *Peptides*, 2003, **24**(7): 955 ~ 961.
- [23] Batista C V F, Silva R D, Sebben A, et al. Antimicrobial peptides from the Brazilian frog *Phyllomedusa distincta*. *Peptides*, 1999, **20**(6): 679 ~ 686.
- [24] Maloy W L, Kari U P. Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers (Peptide Science)*, 1995, **37**: 105 ~ 122.
- [25] Lai R, Zheng Y T, Shen J H, et al. Antimicrobial peptides from skin secretions of Chinese red belly toad *Bombina maxima*. *Peptides*, 2002, **23**(3): 427 ~ 435.
- [26] Rinaldi A C. Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2002, **6**(6): 799 ~ 804.
- [27] Simmaco M, Mignogna G, Canofeni S, et al. Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. *Eur J Biochem*, 1996, **242**(3): 788 ~ 792.
- [28] Andreu D, Rivas L. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers (Peptide Science)*, 1998, **47**(6): 415 ~ 433.
- [29] Oren Z, Shai Y. Mode of action of linear amphipathic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers (Peptide Science)*, 1998, **47**(6): 451 ~ 463.
- [30] 杨博, 王永华. 抗菌肽研究进展. *生命科学*, 2002, **14**(3): 144 ~ 145.
- [31] 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 ~ 271.
- [32] Papagianni M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties; biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnology Advances*, 2003, **21**(6): 465 ~ 499.
- [33] Lai R, Liu H, Lee W H, et al. An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, **295**(4): 796 ~ 799.
- [34] Schröder J M. Epithelial peptide antibiotics. *Biochemical Pharmacology*, 1999, **57**(2): 121 ~ 134.
- [35] Simmaco M, Boman A, Mangoni M L, et al. Effect of glucocorticoids on the synthesis of antimicrobial peptides in amphibian skin. *FEBS Letters*, 1997, **416**(3): 273 ~ 275.
- [36] Rollins-Smith L A, Carey C, Longcore J, et al. Activity of antimicrobial skin peptides from ranid frogs against *Batrachochytrium dendrobatidis*, the chytrid fungus associated with global amphibian declines. *Developmental and Comparative Immunology*, 2002, **26**(5): 471 ~ 479.
- [37] Li Q, Lawrence C B, Xing H Y, et al. Enhanced disease resistance conferred by expression of an antimicrobial magainin analog in transgenic tobacco. *Planta*, 2001, **212**(4): 635 ~ 639.