

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.01241

蛙科两栖动物皮肤抗菌肽的分子多样性及功能

金莉莉, 王秋雨

辽宁大学生命科学院, 沈阳 110036

摘要: 蛙科(Ranidae)是全球分布最广泛的两栖动物, 种类超过 650 种。为开拓和适应广阔的栖息地及多样的生态环境, 其皮肤腺体中进化产生了结构复杂、种类繁多的抗菌肽。它们除具有广谱抗菌活性外, 还有抗肿瘤、抗病毒等生物学活性。蛙科动物皮肤抗菌肽起源于共同祖先, 在漫长的进化过程中, 基因发生了多重复制和突变, 形成了天然抗菌肽的巨大资源库。这些肽在模拟膜的溶剂中几乎都是疏水的, 并带正电荷, 以一种两亲性的 α -螺旋的构象存在。根据氨基酸组成及结构的相似性, 可以将蛙科动物抗菌肽分成 brevinin-1、esculentin-1、esculentin-2、temporin、ranalexin、ranatuerin-1、ranatuerin-2、plastrin、brevinin-2、tigerinin、japonicin、nigrocin 和 melittin 相关肽等若干个家族。文章结合作者的研究工作, 综述了目前已经鉴定的蛙科动物皮肤抗菌肽的分子多样性特点、家族性质和生物学活性的研究进展, 并阐述了东北林蛙新家族抗菌肽的特点。

关键词: 蛙科; 抗菌肽家族; 分子多样性; 生物学活性

Molecular diversities and functions of antibacterial peptides from the skins of Ranidae of amphibians

JIN Li-Li, WANG Qiu-Yu

School of Life Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China

Abstract: Granular glands in the frog skins of Ranidae of amphibians, a widely distributed group with over 650 species, synthesize and secrete a remarkably diverse array of peptides with the broad-spectrum antibacterial, antifungal and other biologic activities to protect the organism against a wide range of pathogens, which are believed to have arisen as a result of multiple gene duplication events. Almost without exception, these components are hydrophobic, cationic and form an amphipathic α -helix in a membrane-mimetic solvent. The peptides can be grouped into families on the basis of structural similarity. To date, brevinin-1, esculentin-1, esculentin-2, and temporin peptides, ranalexin, ranatuerin-1, ranatuerin-2 and palustrin, brevinin-2, tigerinin, japonicin, nigrocin and melittin-related peptides have been found in amphibians of Ranidae. In this paper, the molecular diversity, structural feature and the biological activity of Ranidae antibacterial peptides were reviewed.

Keywords: Ranidae; families of antibacterial peptides; molecular diversity; biological activity

抗菌肽(Antibacterial peptides)是生物体产生的对抗外源性病原体侵袭致病作用的防御性肽类活性

物质, 一般由 10~50 个氨基酸组成, 是机体免疫防卫系统的重要组成部分^[1]。近年来, 抗菌肽已成为相

收稿日期: 2008-02-22; 修回日期: 2008-05-14

基金项目: 辽宁省教育厅高等学校科学研究项目(编号: 05L149) 资助[Supported by the Program of the High School Science Research of the Department of Education of Liaoning Province of China (No. 05L149)]

作者简介: 金莉莉(1971-), 女, 沈阳人, 博士研究生, 副教授, 研究方向: 分子遗传学。E-mail: lilijin@lnu.edu.cn

通讯作者: 王秋雨(1961-), 男, 沈阳人, 博士, 教授, 研究方向: 分子遗传学。Tel: 024-62202074; E-mail: qiuyuwang@lnu.edu.cn

关学科的研究热点,人们一方面希望在分子水平上研究清楚抗菌肽在动物免疫防卫系统中的合成过程、生物学功能及其调控机制,另一方面积极探索抗菌肽的药用开发价值,有望使之成为继青霉素等传统抗生素之后的又一类重要的新型抗菌药物,为解决病原菌对传统抗生素日益增强的耐药性这一棘手的世纪难题提供新途径。

两栖类动物皮肤湿润、裸露,无疑给外界微生物的侵入提供了便利条件,为了自身生存和适应栖息地的多样化生态环境的需要,它们依靠皮肤腺体分泌出一系列抗菌肽,防御外界病原菌的侵袭^[2]。国外学者对两栖类皮肤分泌物的研究已长达 40 多年之久,已报道 500 多种抗菌肽,不同物种的皮肤中贮藏着不同种类的抗菌生物活性分子^[3]。迄今为止,多种抗菌肽的氨基酸序列已被测定,对其结构和功能也进行了较详细的研究。相关研究结果显示,两栖类皮肤多肽目录呈现出超乎想象的分子和功能多样性^[4]。蛙科(Ranidae)是无尾目的第 3 大科,有 50 余属 650 余种,是分布最广泛的两栖动物,几乎遍及各大洲,占据着不同的生态地位,为适应特定环境,它们皮肤抗菌肽在种类和数量等方面,都是极其惊人的^[5]。除在树蛙(*R. sylvatica* S.H.holbrookii)的皮肤分泌物中只分离出一种抗菌肽(brevinin-1)外,其他的蛙科动物大多都可以合成和分泌多种有活性的组分,例如,梭蛙(*R. palustris* LeConte)的皮肤分泌物包含至少 22 种抗菌肽^[3]。我们对东北林蛙(*R. dybowskii* Günther)抗菌肽研究也表明,一只个体可以同时编码表达多达 12 种的成熟抗菌肽。这些肽起源于共同祖先,在进化过程中,基因进行了多重复制和突变,几乎所有得到的肽在模拟膜的溶剂中都是疏水的、带正电荷的,并且以一种两亲性的 α -螺旋的构象存在^[6]。根据结构、序列的相似性,Conlon 等^[3]将蛙科抗菌肽分成 brevinin-1、esculentin-1、esculentin-2、temporin、ranalexin、ranatuerin-1、ranatuerin-2、plaustrin、brevinin-2、tigerinin、japonicin、

nigrocin 和 melittin 相关肽等 13 个家族,迄今为止在 GenBank 中的蛙类抗菌肽目录已达 255 条。本文根据最新文献报道,并结合作者对东北林蛙皮肤抗菌肽的研究工作,按其家族性质,综述了蛙科动物皮肤抗菌肽的分子多样性特点、家族特征和生物学活性等问题的研究进展,并阐述了作者从东北林蛙中克隆得到的两个新家族抗菌肽的分子特点。本文将作为系统认识和了解相关的研究成果,进一步开展蛙类皮肤抗菌肽研究奠定基础。

1 蛙科动物各家族抗菌肽

1.1 brevinin-1 家族

brevinin-1 家族抗菌肽最早是从日本沼蛙(*R. brevipoda porsa* Kawamura)的皮肤中分离得到的^[7],其家族成员在多数北美、欧亚蛙科两栖动物中均有分布。该家族肽基本由 24 个氨基酸残基组成,一、二级结构较保守,N 端第 14 位多为 Pro 残基,结构和功能相关性研究得知这个残基在分子中产生一种稳定的纽结,这种特性可能在跨膜孔道形成方面起着重要的作用^[8]。在 brevinin-1 家族肽的 C 端具有保守性 7 肽序列: cys-3X-lys/arg-lys-cys,二个半胱氨酸间形成分子内二硫键,使其在 C 端形成一个 7 肽的保守环状结构,称为 Rana-box 结构。使用圆二色谱研究表明, brevinin-1 在水溶液中是以随机卷曲的形式存在,而在 50%的三氟乙醇模拟膜溶液中,其构象结构为伸展的 α -螺旋^[9]。

我们对东北林蛙皮肤抗菌肽 cDNA 文库进行克隆测序分析,并结合对分泌物的质谱鉴定结果,得到 4 种 brevinin-1 抗菌肽序列。不同的是,它们仅由 20 个氨基酸残基构成,第 4、7、11、和 12 位氨基酸残基缺失,其 C-端具有典型的 brevinin-1 的 Rana-box 结构,氨基酸序列同源性分析显示,它们与 brevinin-1 肽具有较高的序列一致性,序列中保留了 brevinin-1 肽中保守的氨基酸残基(Ala⁹、Cys¹⁸、Lys²³和 Cys²⁴)及 14 位 Pro(图 1)。

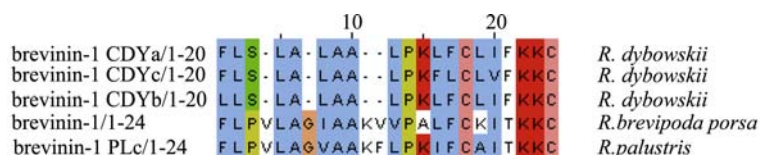


图 1 东北林蛙、日本沼蛙^[7]和梭蛙^[10]皮肤 brevinin-1 家族抗菌肽序列同源对比分析图

Fig. 1 Comparison of sequence similarities between the brevinin-1 peptide isolated from the skin secretion of *Rana dybowskii*, *Rana brevipoda porsa*^[7] and *Rana palustris*^[10]

Brevinin-1 抗菌肽具有广谱的抗细菌和真菌能力, 同时从日本沼蛙中得到的 brevinin-1 还具有抗型和型疱疹病毒活性。但 brevinin-1 同时具有很强的溶血活性^[11~13], 如从池蛙(*R. esculenta* Linnaeus)中得到的 brevinin-1E 的溶血活性(HC_{50})小于 $1 \mu\text{mol/L}$ ^[11], 这将限制其治疗方面的应用前景。线性化的 brevinin-1 抗菌肽可以降低溶血活性而不影响其抗菌活性, Conlon 等^[14]从竖琴蛙(*R. okinavana* Boettger)中鉴定了 4 个 brevinin-1 相关肽, 当 C-末端环状结构被酰胺化修饰替代时, 仍可以抑制大肠杆菌(*Escherichia coli* Castellani)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* Rosenbach)的生长, 表明环状结构对抗菌活性不是必须的。Kwon^[9]对 brevinin-1 的结构、活性相关性研究也表明, 线性的乙酰氨基半胱氨酸甲脂基 brevinin-1 类似物可以减少溶血活性, 但不影响其抑菌活性, 并且 brevinin-1 在还原和羧胺甲基化后仍然拥有抗病毒活性^[15]。Kumari 等^[16]研究表明, 将其 C 端七肽环形结构域移到肽链分子中间区域, 同样可以减少溶血活性, 且不影响它的抗菌活性。

1.2 brevinin-2 家族

brevinin-2 最早从日本沼蛙的皮肤中被分离鉴定^[7], 迄今为止, 已经在亚洲和欧洲的多种蛙科动物中被纯化得到, 包括从韩国粗皮蛙(*R. rugosa* Schlegel)中分离的 gaegurin1-3、从日本粗皮蛙中分离的 rugosinA 和 B^[17,18]。brevinin-2 家族成员为 33 个氨基酸残基的抗菌肽, 同源对比分析显示, 无论在种间还是种内, brevinin-2 家族成员间的一级结构变异较大, 只有 4 个保守氨基酸残基(Lys¹⁵、Cys²⁷、Lys²⁸ 和 Cys³³)。从池蛙^[19,20]和腹斑蛙(*R. ornativentris* Price)^[17]中得到的 brevinin-2 肽, 对革兰氏阳性菌大肠杆菌具有强抑菌活性($MIC < 10 \mu\text{mol/L}$), 对革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌和真菌白色念珠菌[*Candida albicans*(Robin) Berk]也有抑制活性。相对于 brevinin-1 家族而言, brevinin-2 家族肽的溶血活性较小^[12]。

1.3 esculentin-1 和 esculentin-2 家族

esculentin-1 和 esculentin-2 抗菌肽首先是从欧洲池蛙的皮肤中分离得到的^[12]。目前, esculentin 肽已在多种北美蛙如梭蛙^[10]和隙穴蛙(*R. areolata* Rice & Davies)等^[21]和亚洲粗皮蛙、竹叶臭蛙(*R. Odorrana versabilis* Liu & Hu)等的皮肤分泌物中纯化得到。与

brivinin-1、brivinin-2 一样, esculentin-1 和 esculentin-2 均为环状肽, 即在分子的 C 端由两个保守的半胱氨酸形成分子内二硫键, 使 C 端形成一个 7 肽的环形结构。

其中, esculentin-1 为 46 个氨基酸残基的抗菌肽, 与 brevinin 肽相比, 目前已知的 esculentin-1 家族成员一级结构保守, 只存在少数相似极性的氨基酸残基之间的替代, 阳离子氨基酸及环状结构域的 7 个氨基酸非常保守。esculentin-1 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula)和白色念珠菌等^[12]多种致病菌均有很强的抑制力($MIC < 1 \mu\text{mol/L}$), 在医药领域有着十分广阔的应用前景。

esculentin-2 家族的成员为 37 个氨基酸残基的抗菌肽, 与 esculentin-1 相比, esculentin-2 家族的成员间有较多的氨基酸替代, 但多数发生在性质相近的氨基酸间, 阳离子氨基酸和半胱氨酸保守。esculentin-2 具有广谱的抗菌活性, 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌都有强抑制力($MIC < 10 \mu\text{mol/L}$), 同时对白色念珠菌也具有一定的抑制力(MIC 为 $30 \sim 50 \mu\text{mol/L}$ 之间)^[12,13]。

1.4 ranalexin 家族

ranalexin 最早是 Clark^[22]等从北美牛蛙(*R. catesbeiana* Shaw)蝌蚪的抽提物中分离得到的, 在变态期和成熟期均有表达。目前研究发现, ranalexin 只在北美牛蛙的近缘种猪蛙(*R. grylio* Stejneger)和绿蛙(*R. clamitans* Melanota)中有分布^[23]。ranalexin 为 20 个氨基酸残基肽, 含有一个分子内二硫键, 也在 C 端形成一个疏水的 7 肽环状结构。3 个物种中的 ranalexin 只存在少数疏水氨基酸的替代, 一级结构较保守。在水中, 不能形成 ranalexin 的氧化和还原的构象, 在 30%的三氟乙酸中, 分子的中部区域为 α -螺旋构象。

ranalexin 对临床分离得到的革兰氏阳性菌具有广谱的超强抗菌活性, 包括对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis* Evans)和肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae* Chester), 但对一些在临床上一些非常重要的革兰氏阴性菌株, 如铜绿假单胞菌和奇异变形菌(*Proteus mirabilis* Hauser)则没有活性^[24]。ranalexin 抗肠寄生虫小球隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum* Tyzzer)的活性比较低, 但当与传统的抗生素, 如拉

沙洛西和阿齐霉素一起使用时,其活性将会显著增强^[25]。与此类似,ranalexin 和头孢唑啉联合使用,可以阻止表皮葡萄球菌对鼠模型血管假体移植的感染^[26]。

1.5 ranatuerin-1 家族

ranatuerin-1 家族抗菌肽仅在北美牛蛙^[27]、猪蛙^[28]和绿蛙^[23]3 个近缘种的皮肤中发现。Ranatuerin-1 具有 25 个氨基酸残基,分子 C 端含有 7 肽构成环状结构域,在已知的家族成员之间,肽的一级结构保守,只有个别氨基酸替代。使用圆二色谱研究发现,ranatuerin-1 和大多数蛙皮肤抗菌肽相似,在水溶液中以随机卷曲的形式存在,在 50%的三氟乙醇中为 α -螺旋构象。与 ranalexin 相似,用丝氨酸来替代 ranatuerin-1 的半胱氨酸残基,对其构象和生物活性影响较小,表明环状结构对 ranatuerin-1 的生理活性影响不大。结构预测显示,ranatuerin-1 肽由 α -螺旋(残基 1~8), β -片层(残基 11~16)和 β -翻转(残基 20~25)3 个结构域组成。用赖氨酸残基替代 10、13 和 15 位的甘氨酸残基破坏 β -片层结构,可使其抗菌活性显著降低,表明 β -片层结构在 ranatuerin-1 的抗菌活性中具有重要作用。

1.6 ranatuerin-2 家族

ranatuerin-2 家族首先在北美牛蛙的皮肤中得到鉴定^[27],此家族抗菌肽在北美、亚洲蛙中有广泛的分布。目前已鉴定的 ranatuerin-2 家族成员氨基酸残基数从 28~31 不等,其一级结构变异较大,典型的

ranatuerin-2 肽链 N 端 Gly/Ser¹、Ala¹⁵、Lys²² 相对保守,C 端的一致序列 Cys²⁷-Lys²⁸-X-Try³⁰-Gly³¹-Cys³² 由分子内二硫键形成六肽环形结构。ranatuerin-2 家族成员氨基酸序列的多样性使其富有广谱的抗菌活性,如 ranatuerin-2 对大肠杆菌的最小抗菌浓度(MIC)从 2 μ mol/L(ranatuerin-2Cb)到 30 μ mol/L(ranatuerin-2Ara),对金黄色葡萄球菌的 MIC 从 2 μ mol/L(ranatuerin-2B)到大于 200 μ mol/L(ranatuerin-2Ara),而对白色念珠菌的抑菌活性普遍很低,但 ranatuerin-2B 对白色念珠菌的 MIC 为 35 μ mol/L。ranatuerin-2 对人类红细胞的溶血活性(HC₅₀)在 35 μ mol/L(ranatuerin-2Ga)到 200 μ mol/L(ranatuerin-2Byb)之间。

1.7 temporin 家族

temporin 肽首先是从欧洲池蛙^[29]和欧洲林蛙(*R. temporaria* Linnaeus)^[30]的皮肤中得到鉴定,在北美和欧亚大陆的蛙中广泛分布。目前已经分离鉴定了 40 多个家族成员,成员间肽链长度及结构变异较大,活性多样。尽管如此,temporin 肽在结构和性质等方面仍具有如下共同特点:(1)它是目前自然界中发现的最小的两亲性 α -螺旋抗菌肽,由 10 到 14 个氨基酸残基组成,肽分子中包含一个基本氨基酸残基(Lys 或 Arg),Wade 等^[31]根据已知序列,推导出 temporin 共享序列(表 1);(2)不同于 brevinin、ranalexin、ranatuerin 和 esculentin 家族抗菌肽,temporins C-端不含有“Rana box”7 肽环结构,而为 α -酰胺化修饰;(3)相对于其他阳离子抗菌肽,多数 temporins 肽在

表1 temporin家族抗菌肽一级结构及在中性pH时的电荷性质

Table 1 Primary structures and related net charge of temporin family at neutral pH

肽 Peptide	来源 Source	序列 Sequence										静电荷 Net charge		参考文献 Reference	
共享序列 Consensus sequence		110													
		F	L	P	L	I	A	S	L	L	S	KLL	−NH ₂	2	[31]
temporin A	欧洲林蛙 <i>R.temporaria</i>	F	L	P	L	I	G	R	V	L	S	GIL	−NH ₂	2	[34]
temporin-1Ja	日本林蛙 <i>R.japonica</i>	I	L	P	L	V	G	N	L	L	N	DLL	−NH ₂	0	[33]
temporin-CDYa	东北林蛙 <i>R.dybowskii</i>	V	L	P	L	V	G	N	L	L	N	DLL	−NH ₂	1	EU827803*
temporin-CDYb	东北林蛙 <i>R.dybowskii</i>	I	L	P	I	L	A	P	L	I	G	GLL	−NH ₂	1	EU827804*
temporin-CDYc	东北林蛙 <i>R.dybowskii</i>	I	L	P	I	L	−	S	L	I	G	GLL	−NH ₂	0	DQ91544*
temporin-CDYd	东北林蛙 <i>R.dybowskii</i>	F	I	G	P	I	I	S	A	L	A	SLFKG	−NH ₂	2	EU827805*

注: * GenBank收录号。

Note: * GenBank accession No.

中性环境中仅带 1~3 个正电荷。我们从东北林蛙皮肤得到的 3 个成熟肽 temporin-CDYa、temporin-CDYb 和 temporin-CDYc(表 1)与从欧洲林蛙中得到的 temporin-1Od(FLPLLASLFSGLF.NH₂)^[32]和从日本林蛙(*R.japonica* Guenther)中得到的 temporin-1Ja 相似^[33], 分子中缺少 temporin 肽的基本氨基酸残基(Lys 或 Arg), 理化性质分析显示, 在中性环境中, 呈弱酸性。我们得到的另一个肽 temporin-CDYd(表 1)与典型 temporin 序列差异较大, 由 15 个氨基酸残基构成, 其肽前体 C-端为 Gly-Gly, 而不是 Gly-Lys, 因此可直接进行酰胺化修饰, 也属于 temporin 家族, 该抗菌肽 Colon 等^[33]已从日本棕蛙中分离鉴定, 命名为 temporin-1DYa。东北林蛙 temporin 家族抗菌肽序列及特点见表 1; (4)功能多样性。temporins 肽的分子多样性决定了其功能的多样性, 一些 temporin 肽如 temporin1 具有抗细菌、病毒、真菌、酵母、原虫等多种生物活性, MIC 从 1 $\mu\text{mol/L}$ 到大于 100 $\mu\text{mol/L}$; 另一些 temporin 肽还具有免疫调节、抗移植感染、抗败血症、杀伤肿瘤细胞等多种生理活性。

对 temporinA 的结构和活性的研究表明, 疏水的 N-端残基、第 7 位的带正电荷氨基酸残基及第 5 位和第 12 位的疏水残基对抗菌活性有重要关系(表 1), 用亮氨酸来替代异亮氨酸残基可以提高抗菌活性^[34], 但 temporin-1Od 分子中没有正电荷氨基酸, 依然有较强的抑菌活性, 其对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度是 13 $\mu\text{mol/L}$ ^[32]。通过 temporins 与不同磷脂组成的脂质体相互作用的研究表明, 其抗菌机制是通过形成跨膜孔道, 最终导致细菌死亡^[35]。

1.8 palustrin 家族

Conlon 等^[10]对梭蛙的皮肤分泌物进行电刺激, 得到 palustrin-1、-2、-3 三个抗菌肽家族, 它们与蛙科动物中已鉴定的其它抗菌肽序列及结构相似性很小。palustrin 家族肽 C 末端具有分子内二硫键链接而成的六肽环。此家族抗菌肽结构保守, 其中 palustrin-1 家族抗菌肽是由 27 或 28 个残基构成, 含有较多疏水氨基酸, 带 5 个正电荷; palustrin-2 和 palustrin-3 分别含有 31 和 48 个氨基酸残基, palustrin-3 的 N 端区域与 esculentin-1 的序列相似, 但与后者不同, 它只对大肠杆菌有抑菌活性, 对金黄色葡萄球菌没有抑菌活性。目前为止, palustrin-1 和 palustrin-3 只在梭蛙和竹叶蛙中鉴定得到^[10,36], 而 palustrin-2 肽只在梭蛙及其近缘种隙穴蛙的皮肤分泌物中分离得到^[21]。

使用圆二色谱研究显示, 在 10 mmol/L 磷酸钠

缓冲液中(pH 7.0), palustrin-3ARa 是以随机卷曲的形式存在, 在 50%的三氟乙醇溶液中, 呈现 α -螺旋构象^[10]。

1.9 tigerinin 家族

tigerinin 肽是 11~12 个氨基酸残基构成的环形小肽, 同时具备 C-端酰基化修饰的肽家族, 具有广谱的抗菌活性。到目前为止, 只在印度虎纹蛙(*R.tigerina* Wiegmann)的皮肤分泌物中鉴定得到^[37]。使用圆二色谱研究显示, tigerinin 在 HEPES 缓冲液中是以无规卷曲和 β -转角构象混合存在。用亮氨酸或 α -异酪氨酸替代半胱氨酸残基, 可使其完全丧失抑菌活性, 推测线性化的 tigerinin 不能形成 β -转角构象, 而此结构是肽对膜的通透作用所必须的。由赖氨酸残基替代苏氨酸, 来提高肽的阳离子可以提高其抗菌能力; 相反, 以 COOH 集团替代 C-端 CONH₂, 减少肽的阳离子可以导致其活性丧失^[38]。

1.10 japonicin-1 和 japonicin-2 家族

Isaacson 等^[39]从日本林蛙的皮肤中鉴定了两种肽, japonicin-1 和 japonicin-2 (表 2), 它们与蛙科其它家族抗菌肽氨基酸序列相似性较小。与其他环形肽不同, japonicin-2 的环形区域是由 8 个残基构成, 在 50%三氟乙醇溶液中为 α -螺旋构象, 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌都有抑制活性, 最小抑菌浓度分别为 12 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 。japonicin-1 的 C 端为普通的七肽环形结构域, 与 brevinin-2 有一定的结构相似性, 但它只对大肠杆菌有活性, 最小抑菌浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 。Sukwon^[40]等从分布在韩国的东北林蛙皮肤分泌物中鉴定出 japonicin-2 类似肽, 具有广谱抗菌活性及高溶血活性。

1.11 nigrocin-2 家族

Park^[41]最初从分布于韩国的黑斑蛙(*R.nigromaculata* Hallowell)皮肤中分离得到了两种具有抗菌活性的肽, 命名为 nigrocin-1 和 2, 其中 nigrocin-1 是 brevinin-2 家族成员。之后 Zhou^[42]等从大绿蛙(*R.livida* Blyth)皮肤中鉴定出 2 个 nigrocin-2 抗菌肽, nigrocin-2 和其他的蛙科抗菌肽有很少的结构相似性, 长度为 20 或 21 个氨基酸残基。在 50%三氟乙醇溶液中, nigrocin-2 肽 3-18 位的肽段为两亲性的 α -螺旋构象。nigrocin-1 和 2 都具有抗革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌以及白色念珠菌的能力, 且都不具有溶血活性。

表 2 蛙科动物皮肤抗菌肽家族及其代表性肽的氨基酸序列

Table 2 Family and amino acid sequence of representative antibacterial peptides from the skin of Rnidae of amphibians

家族及肽 Family and peptides	来源 Source	抗菌肽氨基酸序列 Amino acid sequence of antibacterial peptides	参考文献 Reference
brevinin-1	日本沼蛙 <i>R. brevipoda porosa</i>	FLPVLGIAA(10)KVVPAFLFCKI(10)TKKC	[7]
brevinin-2	日本沼蛙 <i>R. brevipoda porosa</i>	GLLDSLKGFA(10)ATAGKGVLP(10)LLSTASCKLA(10)KTC	[7]
esculentin-1	池蛙 <i>R. esculenta</i>	GIFSKLGRKK(10)IKNLLISGLK(10)NVGKEVGMDV(10)VRTGID IAGC(10)KIKGEC	[12]
esculentin-2A	池蛙 <i>R. esculenta</i>	GILSLVKGVA(10)KLAGKGLAKE(10)GGKFGLELIA(10)CKIAKQC	[12]
ranalexin	北美牛蛙 <i>R. catesbeiana</i>	FLGGLIKIVP(10)AMICAVTKKC	[22]
ranatuerin-1	北美牛蛙 <i>R. catesbeiana</i>	SMLSVLKNLG(10)KVGLGFVACK(10)INKQC	[27]
ranatuerin-2	北美牛蛙 <i>R. catesbeiana</i>	GLFLDTLKGA(10)AKDVAGKLEG(10)LKCKITGCKL(10)P	[27]
temporinA	欧洲林蛙 <i>R. temporaria</i>	FLPLIGRVLS(10)GIL.NH ₂	[34]
palustris-1a	梭蛙 <i>R. palustris</i>	ALFSILRGLK(10)KLGMKGAFV(10)NCEIYKKC	[10]
palustris-2a	梭蛙 <i>R. palustris</i>	GFLSTVKNLA(10)TNVAGTVLDT(10)IRCKVTGGCR(10)P	[10]
palustris-3a	梭蛙 <i>R. palustris</i>	GIFPKIIGKG(10)IKTGIVNGIK(10)SLVKGVGGMKV(10)FKALN N IGN(10)TGCNEDEC	[10]
tigerinin-1	虎纹蛙 <i>R. tigerina</i>	FCTMIPIPRC(10)Y	[37]
aponicin-1	日本林蛙 <i>R. japonica</i>	FFPIGVFCKI(10)FKTC	[39]
japonicin-2	日本林蛙 <i>R. japonica</i>	FGLPMLSILP(10)KALCILLKRK(10)C	[39]
nigrocin-1	黑斑蛙 <i>R. nigromaculata</i>	GLLDSIKGMA(10)ISAGKGALQN(10)LLKVASCKLD(10)KTC	[41]
MRP(VR-23)	溪赤蛙 <i>R. sakuraii</i>	VIGSILGALA(10)SGLPTLISWI(10)KNR	[45]
dybowskin-1CDYa	东北林蛙 <i>R. dybowskii</i>	IIPLPLGYFA(10)KKT	EU827807*
dybowskin-2CDYa	东北林蛙 <i>R. dybowskii</i>	SAVGRHSRRF(10)GLRKHRRKH	EU827809*

注: * GenBank收录号。

Note: * GenBank accession No.

1.12 melittin 相关肽

由 26 个氨基酸组成的 melittin 肽是蜜蜂毒液中含有的主要肽, 最早从西方蜜蜂(*Apis mellifera* Linnaeus)中分离得到, 后来又从相关的物种小蜜蜂(*Apis florea* Fabricius)和东方蜜蜂(*Apis cerana* Fabricius)中获得^[43]。melittin 具有广谱的抗细菌、抗真菌、抗病毒和抗原生动物的能力。Conlon^[44, 45]从田子蛙(*R. tagoi* Okada)、日本林蛙和溪赤蛙(*Rana sakuraii* Matsui & Matsui)皮肤中分离得到的一类肽与 melittin 有较高的序列同源性, 命名为 melittin 相关肽(melittin-related peptide, MRP)。MRP 表现出广谱的抗细菌和抗酵母菌的活性, 且比 melittin 的溶血性低 13 倍, 但不同于 melittin, MRP 没有抗病毒活性^[44]。

1.13 dybowskin-1 和 dybowskin-2 家族

我们从东北林蛙中得到的抗菌肽 dybowskin-1 CDYa(表 2)由 13 个氨基酸构成, 属于至今已发现的较短的抗菌肽之一, 但由于其带正电荷, 不具有酰胺化修饰, 与 temporin 家族明显不同, 它应属于尚未报道的另一个蛙类新家族抗菌肽, 其生物学活性尚在研究之中。

此外我们从东北林蛙中得到的另一个抗菌肽 dybowskin-2CDYa(表 2)与以往发现的其他蛙类抗菌肽氨基酸组成和序列的相似性很小, 由 18 个氨基酸残基构成, 含有 7 个带正电荷氨基酸, 呈强碱性。根据该肽的序列特点和组成判断, 它应属于尚未报道的蛙类新家族抗菌肽, 有关其生物学活性尚在研究之中。

2 结语

两栖类是我国宝贵的自然资源之一, 有近 300 个物种分布在中国大陆, 其中 2/3 为中国特有种。相比之下, 在分子水平上对我国两栖类皮肤分泌物的研究深度与广度远落后于国外。根据我们对我国东北林蛙皮肤抗菌肽的初步研究表明, 一只东北林蛙个体可以同时表达分泌多达 12 种的成熟抗菌肽, 除已报道的抗菌肽家族外, 还存在结构新、抗菌谱广及低溶血活性的新家族抗菌肽。因此, 我们应充分利用自己的资源优势, 加快两栖类皮肤中的抗菌多肽的鉴定研究, 以保护我国的相关知识产权。更重要的是, 加快此类抗菌肽的应用基础研究, 有望使之成为继青霉素等传统抗生素之后又一类重要的新

型抗菌药物, 将为解决病原菌对传统抗生素的耐药性提供新途径。另外, 由于受到紫外线和生态环境破坏以及其他人为因素的影响, 当今全球两栖类的种类和数量日渐下降, 我们还应努力在分子水平上研究抗菌肽在两栖动物免疫防卫系统中的合成过程及其调控机制, 为其资源保护提供理论依据。

参考文献(References):

- [1] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 2002, 415(6870): 389–395. [\[DOI\]](#)
- [2] ZHANG Yun. Amphibian skin secretions and Bio-adaptive significance implications from *Bombina orientalis* skin secretion proteome. *Zoological Research*, 2006, 27(1): 101–112.
张云. 两栖类动物皮肤分泌物及其生物学适应意义——大蟾蜍皮肤分泌物蛋白质多肽组的启示. *动物学研究*, 2006, 27(1): 101–112.
- [3] Conlon JM, Kolodziejek J, Nowotny N. Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1696(1): 1–14.
- [4] GOU Xiao-Jun, WU Xiao-Yong, YANG Can-Yu. The research progress in the peptide antibiotics from amphibian skin. *Journal of Chengdu University (Natural Science)*, 2006, 25(1): 25–30.
苟小军, 邬晓勇, 杨灿宇蛙皮多肽抗生素的研究进展. *成都大学学报(自然科学版)*, 2006, 25(1): 25–30.
- [5] XIE Feng, YE Chang-Yuan, FEI Liang, JIANG Jian-Ping, ZENG Xiao-Mao. Taxonomical studies on brown frogs(*Rana*) from northeastern China. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 1999, 24(2): 225–231.
谢锋, 叶昌媛, 费梁, 江建平, 曾晓茂. 中国东北地区林蛙属物种的分类学研究. *动物分类学报*, 1999, 24(2): 225–231.
- [6] Tennesen JA, Blouin MS. Selection for antimicrobial Peptide diversity in frogs leads to gene duplication and low allelic variation. *J Mol Evol*, 2007, 65(5): 605–615. [\[DOI\]](#)
- [7] Morikawa N, Hagiwara K, Nakajima T. Brevinin-1 and -2, unique antimicrobial peptides from the skin of the frog, *Rana brevipoda porsa*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 189(1): 184–190. [\[DOI\]](#)
- [8] Suh JY, Lee KH, Chi SW, Hong SY, Choi BW, Moon HM, Choi BS. Unusually stable helical kink in the antimicrobial peptide—a derivative of gaegurin. *FEBS Lett*, 1996, 392(3): 309–312.
- [9] Kwon MY, Hong SY, Lee KH. Structure-activity analysis brevinin 1E amide, an antimicrobial peptide from *Rana esculenta*. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1387(1–2): 239–248.
- [10] Basir YJ, Knoop FC, Dulka J, Conlon JM. Multiple antimicrobial peptides and peptides related to bradykinin and neuromedin N isolated from the skin secretions of the North American pickerel frog, *Rana palustris*. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1543(1): 95–105.
- [11] Conlon JM, Sonnevend A, Patel M, Davidson C, Nielsen PF, Pál T, Rollins-Smith LA. Isolation of peptides of the brevinin-1 family with potent candidacidal activity from the skin secretions of the frog *Rana boylii*. *J Peptide Res*, 2003, 62(5): 207–213. [\[DOI\]](#)
- [12] Matutte B, Storey KB, Knoop FC, Conlon JM. Induction of synthesis of an antimicrobial peptide in the skin of the freeze-tolerant frog, *Rana sylvatica* in response to environmental stimuli. *FEBS Lett*, 2000, 483(2–3): 135–138. [\[DOI\]](#)
- [13] Goraya J, Wang Y, Li Z, O'Flaherty M, Knoop FC, Platz JE, Conlon JM. Peptides with antimicrobial activity from four different families isolated from the skins of the North American frogs, *Rana luteiventris*, *Rana berlandieri* and *Rana pipiens*. *Eur J Biochem*, 2000, 267(3): 894–900. [\[DOI\]](#)
- [14] Conlon JM, Sonnevend A, Jouenne T, Coquet L, Cosquer D, Vaudry H, Iwamuro S. A family of acyclic brevinin-1 peptides from the skin of the Ryukyu brown frog *Rana okinavana*. *Peptide*, 2005, 26(2): 185–190. [\[DOI\]](#)
- [15] Yasin B, Pang M, Turner JS, Cho Y, Dinh NN, Waring AJ, Lehrer RI, Wagar EA. Evaluation of the inactivation of infectious herpes simplex virus by host-defense peptides. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2000, 19(3): 187–194. [\[DOI\]](#)
- [16] Kumari VK, Nagaraj R. Structure–function studies on the amphibian peptide brevinin 1E: translocating the cationic segment from the C-terminal end to a central position favors selective antibacterial activity. *J Pept Res*, 2001, 58(5): 433–441. [\[DOI\]](#)
- [17] Park JM, Lee JY, Moon HM, Lee BJ. Antimicrobial peptides from the skin of a Korean frog, *Rana rugosa*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 205(1): 948–954. [\[DOI\]](#)
- [18] Suzuki S, Ohe Y, Okubo T, Kakegawa T, Tatemoto K. Isolation and characterization of novel antimicrobial peptides, rugosins A, B and C, from the skin of the frog, *Rana rugosa*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 212(1): 249–254. [\[DOI\]](#)
- [19] Ali MF, Knoop FC, Vaudry H, Conlon JM. Characterization of novel antimicrobial peptides from the skins of frogs of the *Rana esculenta* complex. *Peptides*, 2003, 24(7): 955–961. [\[DOI\]](#)
- [20] Wang Y, Knoop FC, Remy-Jouet I, Delarue C, Vaudry H, Conlon JM. Antimicrobial peptides of the brevinin-2 family isolated from gastric tissue of the frog, *Rana esculenta*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 253(3): 600–603. [\[DOI\]](#)
- [21] Ali MF, Lips KR, Knoop FC, Fritzsche B, Miller C, Conlon JM. Antimicrobial peptides and protease inhibitors in the skin secretions of the crawfish frog, *Rana areolata*. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1601(1): 55–63.

- [22] Clark DP, Durell S, Maloy WL, Zasloff M. A novel antimicrobial peptide from bullfrog (*Rana catesbeiana*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic, polymyxin. *J Bio Chem*, 1994, 269(14): 10849–10855.
- [23] Halverson T, Basir YJ, Knoop FC, Conlon JM. Purification and characterization of antimicrobial peptides from the skin of the North American green frog *Rana clamitans*. *Peptides*, 2000, 21(4): 469–476. [\[DOI\]](#)
- [24] Giacometti A, Cirioni O, Greganti G, Quarta M, Scalise G. *In vitro* activities of membrane-active peptides against gram-positive and gram-negative aerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42(12): 3320–3324.
- [25] Giacometti A, Cirioni O, Barchiesi F, Scalise G. Anticryptosporidial activity of ranalexin, lasalocid and azithromycin alone and in combination in cell lines. *J Antimicrob Chemother*, 2000, 45(3): 375–377. [\[DOI\]](#)
- [26] Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, Goffi L, Mocchegiani F, Riva A, Scalise G, Saba V. Polycationic peptides as prophylactic agents against methicillin-susceptible or methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* vascular graft infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(12): 3306–3309. [\[DOI\]](#)
- [27] Goraya J, Knoop FC, Conlon JM. Ranatuerins: antimicrobial peptides isolated from the skin of the American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 250(3): 589–592. [\[DOI\]](#)
- [28] Kim JB, Halverson T, Basir YJ, Dulka J, Knoop FC, Abel PW, Conlon JM. Purification and characterization of antimicrobial peptides from skin extracts and skin secretions of the North American pig frog *Rana grylio*. *Regul Pept*, 2000, 90(1-3): 53–60. [\[DOI\]](#)
- [29] Simmaco M, De Biase D, Severini C, Aita M, Erspamer GF, Barra D, Bossa F. Purification and characterization of bioactive peptides from skin extracts of *Rana esculenta*. *Biochim Biophys Acta*, 1990, 1033(3): 318–323.
- [30] Simmaco M, Mignogna G, Canofeni S, Miele R, Mangoni ML, Barra D. Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. *Eur J Biochem*, 1996, 242(3): 788–792. [\[DOI\]](#)
- [31] Wade D, Silveira A, Silberring J, Kuusela P, Lankinen H. Temporin antibiotic peptides: a review and derivation of a consensus sequence. *Prot Peptide Letters*, 2000, 7(3): 349–357.
- [32] Goraya J, Knoop FC, Conlon JM. Ranatuerin 1T: an antimicrobial peptide isolated from the skin of the frog *Rana temporaria*. *Peptides*, 1999, 20(2): 159–163. [\[DOI\]](#)
- [33] Isaacson T, Soto A, Iwamuro S, Knoop FC, Conlon JM. Antimicrobial peptides with atypical structural features from the skin of the Japanese brown frog *Rana japonica*. *Peptides*, 2002, 23(3): 419–425. [\[DOI\]](#)
- [34] Wade D, Silberring J, Soliymani R, Heikkinen S, Kilpeläinen I, Lankinen H, Kuusela P. Antibacterial activities of temporin A analogs. *FEBS Lett*, 2000, 479(1-2): 6–9. [\[DOI\]](#)
- [35] Mangoni ML, Rinaldi AC, Di Giulio A, Mignogna G, Bozzi A, Barra D, Simmaco M. Structure–function relationships of temporins, small antimicrobial peptides from amphibian skin. *Eur J Biochem*, 2000, 267(5): 1447–1454. [\[DOI\]](#)
- [36] Chen T, Zhou M, Rao P, Walker B, Shaw C. The Chinese bamboo leaf odorous frog (*Rana (Odorrana) versabilis*) and North American *Rana* frogs share the same families of skin antimicrobial peptides. *Peptides*, 2006, 27(7): 1738–1744. [\[DOI\]](#)
- [37] Sai KP, Jagannadham MV, Vairamani M, Raju NP, Devi AS, Nagaraj R, Sitaram N. Tigerinins: novel antimicrobial peptides from the Indian frog, *Rana tigerina*. *J Biol Chem*, 2001, 276(4): 2701–2707. [\[DOI\]](#)
- [38] Sitaram N, Sai KP, Singh S, Sankaran K, Nagaraj R. Structure–function relationship studies on the frog skin antimicrobial peptide tigerinin 1: design of analogs with improved activity and their action on clinical bacterial isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(7): 2279–2283. [\[DOI\]](#)
- [39] Isaacson T, Soto A, Iwamuro S, Knoop FC, Conlon JM. Antimicrobial peptides with atypical structural features from the skin of the Japanese brown frog *Rana japonica*. *Peptides*, 2002, 23(3): 419–425. [\[DOI\]](#)
- [40] Kim SS, Shim MS, Chung J, Lim DY, Lee BJ. Purification and characterization of antimicrobial peptides from the skin secretion of *Rana dybowskii*. *Peptides*, 2007, 28(8): 1532–1539. [\[DOI\]](#)
- [41] Park S, Park SH, Ahn HC, Kim S, Kim SS, Lee BJ, Lee BJ. Structural study of novel antimicrobial peptides, nigrocins, isolated from *Rana nigromaculata*. *FEBS Lett*, 2001, 507(1): 95–100. [\[DOI\]](#)
- [42] Zhou M, Chen T, Walker B, Shaw C. Lividins: novel antimicrobial peptide homologs from the skin secretion of the Chinese Large Odorous frog, *Rana (Odorrana) livida*. Identification by "shotgun" cDNA cloning and sequence analysis. *Peptides*, 2006, 27(9): 2118–2123. [\[DOI\]](#)
- [43] Kreil G. Structure of melittin isolated from two species of honey bees. *FEBS Lett*, 1973, 33(2): 241–244. [\[DOI\]](#)
- [44] Conlon JM, Sonnevend A, Patel M, Camasamudram V, Nowotny N, Zilahi E, Iwamuro S, Nielsen PF, Pál T. A melittin-related peptide from the skin of the Japanese frog, *Rana tagoi* with antimicrobial and cytolytic properties. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 306(2): 496–500. [\[DOI\]](#)
- [45] Suzuki H, Iwamuro S, Ohnuma A, Coquet L, Leprince J, Jouenne T, Vaudry H, Taylor CK, Abel PW, Conlon JM. Expression of genes encoding antimicrobial and bradykinin-related peptides in skin of the stream brown frog *Rana sakuraii*. *Peptides*, 2007, 28(3): 505–514. [\[DOI\]](#)

