

• 临床检验研究论著 •

抗菌肽人 β 防御素 3 融合糖类结合域对葡萄球菌的抑制作用*黄洁雯^{1,2}, 郭晓奎^{1,2}, 李擎天^{2△}

(1. 上海交通大学医学院免疫与病原生物学系, 上海 200025; 2. 上海交通大学医学院检验系, 上海 200025)

摘要:目的 探讨抗菌肽人 β 防御素 3 融合糖类结合域(hBD3-CBD)对金黄色葡萄球菌 N315、表皮葡萄球菌 35984 的抑制作用。方法 以直接杀伤和分子生物学方法检测 hBD3-CBD 对金黄色葡萄球菌 N315 和表皮葡萄球菌 35984 菌株的抑制作用以及对细菌关键基因表达的影响。结果 直接杀菌作用显示, 抗菌肽 hBD3 以及 hBD3-CBD 对金黄色葡萄球菌 N315、表皮葡萄球菌 35984 均有显著的抑制作用; hBD3-CBD 的抑制作用强于 hBD3; hBD3-CBD 抑制作用的稳定性亦强于 hBD3。在金黄色葡萄球菌 N315、表皮葡萄球菌 35984 的关键基因表达检测中, hBD3-CBD 对葡萄球菌的 *agr* 和 *mecA* 基因表达有显著抑制作用, 还抑制表皮葡萄球菌 *icaA* 基因的表达和促进 *icaR* 基因表达, 这说明 hBD3-CBD 能够抑制表皮葡萄球菌的生物膜形成。结论 抗菌肽的融合策略对于改善抗菌肽的抑菌效能意义重大, 并为其未来的应用带来更多希望。

关键词: 抗菌肽; 葡萄球菌, 金黄色; 葡萄球菌, 表皮

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.13.006

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)13-1678-03

Inhibition role of fusing antimicrobial peptides human β -defensin 3 and carbohydrate binding domain on staphylococcus*Huang Jiewen^{1,2}, Guo Xiaokui^{1,2}, Li Qingtian^{2△}

(1. Department of Immunology and Microbiology; 2. Department of Laboratory Medicine,

School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

Abstract: Objective To explore the inhibition of fusing antimicrobial peptides human β -defensin 3 and carbohydrate binding domain on *Staphylococcus aureus* N315 and *Staphylococcus epidermidis* 35984. **Methods** The direct bactericidal test and other molecular biology methods were adopted to detect the inhibition role on *Staphylococcus aureus* strain N315 and *Staphylococcus epidermidis* strain 35984 and the influence on the key genes expression. **Results** The direct bactericidal test demonstrated that antimicrobial peptides hBD3 and hBD3-CBD had significantly inhibitory effects on *staphylococcus aureus* N315 and *staphylococcus epidermidis* 35984; the inhibitory effects of hBD3-CBD was stronger than that of hBD3; the stability of the inhibitory effects of hBD3-CBD also stronger than that of hBD3. In the key gene expression test, there were significant inhibitions on the *agr* and *mecA* gene expressions in *Staphylococcus aureus* N315 and *Staphylococcus epidermidis* 35984 by hBD3-CBD. At the same time, hBD3-CBD could inhibit the *icaA* gene expression and promote *icaR* gene expression in *Staphylococcus epidermidis* 35984, which indicated that hBD3-CBD could inhibit the biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. **Conclusion** The fusion strategy of antimicrobial peptide has very important significance for improving the antibacterial efficacy of antimicrobial peptides and brings more hope in their future applications.

Key words: antimicrobial peptide; *staphylococcus aureus*; *staphylococcus epidermidis*

葡萄球菌是最常见的细菌性病原体之一。其中, 金黄色葡萄球菌是造成许多严重医院和社区感染的主要病原体, 可在皮肤、前鼻腔等多个人体部位定植和感染, 最常见的是皮肤和软组织感染^[1]。目前, 全球范围内临床分离的菌株超过 60% 为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA), MRSA 已成为与耐药结核分枝杆菌等齐名的“超级细菌”。表皮葡萄球菌则是当前临床上最重要的导管相关感染病原体, 其多重耐药性以及生物膜的形成能力是该菌在近年来感染不断增加的重要因素。而生物膜的形成对耐药性的产生和保持又有重要的推动作用^[2]。在现今导管使用越来越多、抗菌药物使用越来越频繁的背景下, 表皮葡萄球菌具有特有的定植优势, 在未来医院感染中将居于更加重要的地位。

目前, 抗菌药物外的抗感染手段的研究主要包括对噬菌体、细胞壁水解酶以及以抗微生物肽(antimicrobial peptide, AMP)等的研究。AMP 是一类小分子量蛋白, 对细菌、病毒、真菌具有广谱抗菌活性。其中, 防御素(HBD)是重要的人体 AMP, 人 β 防御素 3(human β defensin 3, hBD3)不仅对细菌、病毒、真菌等病原体有广谱的抑制作用, 而且能够在人体血清

(生理性盐)浓度下发挥抑菌活性^[3]。

抗菌肽作为抑菌制剂具有其特定的优越性, 比如以极低的浓度即能发挥其抗菌作用, 抗菌作用强, 不受细菌对抗菌药物耐药性的影响等^[4]。许多抗菌肽来自人体本身, 即便是外源性抗菌肽, 也因为其分子量小, 一般不会引起人体的免疫反应。小分子多肽在体内环境下不稳定, 这一方面降低了其导致临床不良反应的可能性, 另一方面也可能影响到其抗菌效力。

本研究以金黄色葡萄球菌 N315 和表皮葡萄球菌 35984 作为临床常见的重要病原菌为例, 通过直接杀菌实验、稳定性实验以及对两种葡萄球菌重要功能基因表达的影响, 探讨人 β 防御素 3 融合糖类结合域这一抗菌肽的融合策略对葡萄球菌等导管相关感染病原菌的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料 金黄色葡萄球菌 N315 菌株由瑞金医院韩立中博士惠赠, 表皮葡萄球菌 35984 菌株由上海市第九人民医院谭红略博士惠赠。细菌 RNA 抽提、反转录及定量 PCR 试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司; 6 孔、96 孔细胞培养板购自美国 BD 公司; 荧光定量 PCR 反应在 ABI 7500 FAST 仪器

(Applied Biosystems, 美国)上进行。

1.2 抗菌肽 hBD3、hBD3-CBD 的合成 抗菌肽 hBD3、hBD3-CBD 均由上海赛百盛公司合成,其氨基酸序列分别为 MGI INT LQK YYC RVR GGR CAV LSC LPK EEQ IGK CST RGR KCC RRK K 和 MGI INT LQK YYC RVR GGR CAV LSC LPK EEQ IGK CST RGR KCC RRK KGG GQH DGN FVV Y。

1.3 抗菌肽 hBD3、hBD3-CBD 对金黄色葡萄球菌 N315 菌、表皮葡萄球菌 35984 菌的直接杀菌作用与杀菌稳定性 含 1×10^5 的 MRSA N315 菌株、表皮葡萄球菌 35984 菌株的 1 mL 酪蛋白肉汤培养基用于杀菌实验,分别做 3 个平行管,加入 10 $\mu\text{g/mL}$ 终浓度的抗菌肽 hBD3、hBD3-CBD 进行试验。37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 1 h。通过平板稀释法,在次日检测各管中的活菌数(CFU)来判断杀菌能力。分别在抗菌肽 hBD3、hBD3-CBD 溶解后,使用 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存 1、2、4、8 周后的抗菌肽以上述方法做抑菌试验。37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 1 h。通过平板稀释法,在次日检测各管中的活菌数(CFU),并以其与对照组的比值来判断杀菌能力。

1.4 抗菌肽 hBD3、hBD3-CBD 对金黄色葡萄球菌 N315、表皮葡萄球菌 35984 重要功能基因表达的影响 37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 1 h。然后以溶葡萄球菌酶溶解细菌,抽提细菌 RNA,进行逆转录和实时 PCR 检测。以 16s rDNA 表达为参照,计算重要功能基因 *icaA*、*icaD*、*icaR*、*agr*、*mecA* 的相对表达量,并将实验组的相对表达量和对照组进行比较,确定抗菌肽对这些基因表达的影响。所用的引物序列如下:*icaA* 引物为 AAC AAG TTG AAG GCA TCT CC 和 GAT GCT TGT TTG ATT CCC T^[5],*icaR* 引物为 CCA TTG ACG GAC TTT ACC AG 和 CAA AGC GAT GTG CGT AGG A,*agr* 引物为 CTA CAA AGT TGC AGC GAT GGA TT 和 TAA ATG GGC AAT GAG TCT GTG AG,16srDNA 引物为 TCG TGT CGT GAG ATG TTG GGT TA 和 GGT TTC GCT GCC CTT TGT ATT GT,*mecA* 引物为 GTT GTA GTT GTC GGG TTT G 和 TCC ACA TTG TTT CGG TCT。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抗菌肽 hBD3、hBD3-CBD 对金黄色葡萄球菌 N315、表皮葡萄球菌 35984 的直接杀菌作用与杀菌稳定性 直接杀菌作用结果显示抗菌肽 hBD3、hBD3-CBD 对金黄色葡萄球菌 N315、表皮葡萄球菌 35984 均有显著的杀菌作用,其中,hBD3-CBD 的杀灭作用优于 hBD3。杀菌稳定性结果显示在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存时,抗菌肽 hBD3 对金黄色葡萄球菌 N315、表皮葡萄球菌 35984 的杀菌作用可保持 2~4 周(第 4 周起与对照组比较差异无统计学意义, $P > 0.05$);而抗菌肽 hBD3-CBD 对金黄色葡萄球菌 N315、表皮葡萄球菌 35984 的杀菌作用可稳定 4~8 周(第 8 周起与对照组比较差异无统计学意义, $P > 0.05$)。

2.2 抗菌肽 hBD3、hBD3-CBD 对金黄色葡萄球菌 N315、表皮葡萄球菌 35984 重要功能基因表达的影响 结果发现,抗菌肽 hBD3-CBD 对金黄色葡萄球菌 N315、表皮葡萄球菌 35984 重要功能基因 *agr*、*mecA* 有抑制作用;对表皮葡萄球菌 35984 重要功能基因 *icaA* 有抑制作用,同时可上调 *icaR* 的表达(与对应对照组比较差异有统计学意义, $P < 0.05$)。

3 讨论

耐甲氧西林葡萄球菌(MRS)是造成医院感染的主要病原体之一;MRS 的感染导致比耐甲氧西林敏感葡萄球菌(MSS)

感染更高的致病和病死率。MRS 耐药性的日益增加使得新的抗感染剂的需求愈加迫切^[6]。同时,MRS 也是临床上导管相关感染的主要病原菌,尤其产生物膜的表皮葡萄球菌,更是高居导管相关感染病原菌的首位。

AMP 是一类小分子量蛋白,对细菌、病毒、真菌具有广谱抗菌活性。这类蛋白往往具有亲水和疏水端,使得其既能在环境中显示水溶性,又能进入脂膜^[7]。有些 AMP 的作用靶点在胞内,但多数 AMP 都是作用于细菌的细胞壁^[8]。AMP 对抗菌药物耐药的感染性菌株也有杀灭作用,同时人体 AMP 是内生蛋白,不会导致超敏反应,这使得应用这种“天然抗菌素”进行抗菌治疗以应对感染成为可能。AMP 的另一优点是杀菌作用速度快,特别适用于临床治疗^[9]。目前,AMP 被认为是可能替代或者联合抗菌药物用于治疗耐药病原体感染的理想方法之一。

本研究探讨抗菌肽人 β 防御素 3 融合糖类结合域对导管相关感染病原体金黄色葡萄球菌 N315、表皮葡萄球菌 35984 的抑制作用。由于抗菌肽的杀菌作用快速而直接,故经常以短时间的直接杀菌效应来评估其杀菌能力^[10-11]。本研究中的直接杀菌作用显示,抗菌肽 hBD3 以及 hBD3-CBD 对金黄色葡萄球菌 N315、表皮葡萄球菌 35984 均有显著的抑制作用;hBD3-CBD 的抑制作用强于 hBD3。这表明融合了糖类结合域的抗菌肽的杀菌作用更强。这可能是由于糖类结合域与细菌细胞壁的肽聚糖存在相互作用,使得细菌周围的抗菌肽实际浓度更高所致。本研究中的糖类结合域也是肽聚糖识别蛋白(peptidoglycan recognition proteins, PGRP),后者正在受到越来越多的研究和关注。在实际应用中,治疗性药物面临的挑战之一便是在实现治疗作用的同时,减少不良反应。由于人体细胞膜主要成分为蛋白质和脂类,因此可以预见,融合了糖类结合域的抗菌肽在增强其杀菌作用的同时,有望对人体细胞膜有更多作用。

稳定性实验结果显示,hBD3-CBD 抑制作用的稳定性强于 hBD3。对于抗菌肽这样的小肽而言,提高稳定性是最终应用的一大瓶颈。一般来说,稳定性与相对分子量大小、高级结构以及所带电荷都有关系。融合策略可望成为提高抗菌肽稳定性的策略之一。当然,如何融合,融合什么样的结构域才能够最具性价比地增强抗菌肽的稳定性,这一点尚待更多研究。

在金黄色葡萄球菌 N315、表皮葡萄球菌 35984 的关键基因表达检测中,hBD3-CBD 对金黄色葡萄球菌 N315、表皮葡萄球菌 35984 的 *agr* 和 *mecA* 基因表达有显著抑制作用。由于这两种重要基因和葡萄球菌的耐药性密切相关,这表明,抗菌肽有可能和抗菌药物合用,而增强抗菌药物的作用效能^[12]。

本研究还显示,hBD3-CBD 抑制表皮葡萄球菌 *icaA* 基因的表达和促进 *icaR* 基因表达。*Ica* 基因家族是表皮葡萄球菌生物膜形成的主要控制因子,其中,*icaA* 是促进生物膜形成的因子之一,*icaR* 则是抑制生物膜形成的主要因子。抗菌肽 hBD3-CBD 的这一作用说明 hBD3-CBD 对表皮葡萄球菌的生物膜形成有抑制作用。

多组分的融合 AMP 可以提高各组分的杀菌能力^[13];同时,融合 AMP 还是增加 AMP 稳定性的理想方法^[14]。也就是说,小分子量肽的优势之一就是不容易引起机体免疫反应,但短于 12 个氨基酸的小肽在应用过程中将面临本身稳定性的问题^[15]。AMP 已经被证实是天然免疫应对微生物感染的必要组分,但其作为抗菌制剂尚未投入应用。临床试验的结果也并不理想,这可能受制于其稳定性有限以及作用时间较短的原因。因此,AMP 的生物学活性和功能检测,包括其作为内源性

抗生素以及炎症调节因子的评价是未来研究的重要工作。

本文结果显示,融合了糖类结合域的抗菌肽 hBD3-CBD 的抑菌活性优于 hBD3,且对表皮葡萄球菌生物膜的形成有一定的抑制作用。在未来新抗菌材料的研发中,抗菌肽有理由占居一席之地。同时,也应该注意抗菌肽可能的不良反应,以及避免重蹈抗菌药物滥用的覆辙。

参考文献

[1] Casey AL, Lambert PA, Elliott TS. Staphylococci[J]. Int J Antimicrob Agents, 2007, 29(1): 23-32.

[2] Otto M, Echner H, Voelter W, et al. Pheromone cross-inhibition between Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis [J]. Infect Immun, 2001, 69(17): 1957-1960.

[3] Sawamura D, Goto M, Shibaki A, et al. Beta defensin-3 engineered epidermis shows highly protective effect for bacterial infection [J]. Gene Ther, 2005, 12(8): 857-861.

[4] Li Q, Huang J, Guo H, et al. Bactericidal activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus of a novel eukaryotic therapeutic recombinant antimicrobial peptide[J]. Int J Antimicrob Agents, 2012, 39(4): 496-499.

[5] Kajiyama S, Tsurumoto T, Osaki M, et al. Quantitative analysis of Staphylococcus epidermidis biofilm on the surface of biomaterial [J]. J Orthop Sci, 2009, 14(6): 769-775.

[6] Appelbaum PC. Microbiology of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus[J]. Clin Infect Dis, 2007, 45(Suppl 3): S165-170.

[7] Izadpanah A, Gallo RL. Antimicrobial peptides[J]. J Am Acad Dermatol, 2005, 52(3 Pt 1): 381-390.

(上接第 1677 页)

剂量依赖性,对肿瘤细胞 NB4 的凋亡作用与下调 Bcl-2 的表达有关系。COX-2 有希望成为治疗白血病新的基因靶点,而 COX-2 选择性抑制剂将会成为一种有前景的白血病治疗药物。

参考文献

[1] Rouzer CA, Marnett LJ. Cyclooxygenases: structural and functional insights[J]. J Lipid Res, 2009, 50(1): 29-34.

[2] Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology[J]. Annu Rev Biochem, 2000, 69(1): 145-182.

[3] Rouzer CA, Marnett LJ. Mechanism of free radical oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cyclooxygenases[J]. Chem Rev, 2003, 103(21): 2239-2304.

[4] Zha S, Yegnasubramanian V, Nelson WG, et al. Cyclooxygenase in cancer: progress and perspective[J]. Cancer Lett, 2004, 215(1): 18-20.

[5] Bernard MP, Bbancos S, Sime PJ, et al. Targeting Cyclooxygenase-2 in Hematological Malignancies: Rationale and Promise[J]. Curr Pharm Des, 2008, 14(21): 2051-2060.

[6] Ryan EP, Pollock SJ, Kaur K, et al. Constitutive and activation-inducible cyclooxygenase-2 expression enhances survival of chronic lymphocytic leukemia B cells[J]. Clin Immunol, 2006, 20(1): 76-90.

[7] Ohsawa M, Fukushima H, Ikura Y, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in Hodgkin's lymphoma: its role in cell proliferation and angiogenesis[J]. Leuk Lymphoma, 2006, 7(9): 1863-1871.

[8] Elder DJ, Halton DE, Crew TE, et al. Apoptosis induction and cyclooxygenase-2 regulation in human colorectal adenoma and carci-

[8] Toke O. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections[J]. Biopolymers, 2005, 80(6): 717-735.

[9] Ostberg N, Kaznessis Y. Protegrin structure-activity relationships: using homology models of synthetic sequences to determine structural characteristics important for activity[J]. Peptides, 2005, 26(2): 197-206.

[10] Li Q, Zhou Y, Dong K, et al. Potential therapeutic efficacy of a bactericidal-immunomodulatory fusion peptide against methicillin-resistant Staphylococcus aureus skin infection[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 86(2): 305-309.

[11] Brissette CA, Lukehart SA. Mechanisms of decreased susceptibility to beta-defensins by Treponema denticola[J]. Infect Immun, 2007, 75(20): 2307-2315.

[12] Gordon YJ, Romanowski EG, McDermott AM. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs[J]. Curr Eye Res, 2005, 30(7): 505-515.

[13] He J, Eckert R, Pharm T, et al. Novel synthetic antimicrobial peptides against Streptococcus mutans[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(13): 1351-1358.

[14] Guo C, Diao H, Lian Y, et al. Recombinant expression and characterization of an epididymis-specific antimicrobial peptide BIN1b/SPAG11E[J]. J Biotechnol, 2009, 139(1): 33-37.

[15] Tam JP, Lu YA, Yang JL. Antimicrobial dendrimeric peptides[J]. Eur J Biochem, 2002, 269(8): 923-932.

(收稿日期: 2014-01-23)

noma cell lines by the cyclooxygenase-2-selective non steroidal anti inflammatory drug NS-398[J]. Int J Cancer, 2000, 86(4): 553-560.

[9] Kunda N, Fulton AM. Selective cyclooxygenase COX-1 or COX-2 inhibitors control metastatic disease in a murine model of breast cancer[J]. Cancer Res, 2002, 62(8): 2343-2346.

[10] Waskewich C, Blumenthal RD, Li HL, et al. Celecoxib exhibits the greatest potency amongst cyclooxygenase (COX) inhibitors for growth inhibition of COX-2-negative hematopoietic and epithelial cell lines[J]. Cancer Res, 2002, 62(7): 2029-2033.

[11] Rocca B, Morosetti R, Habib A, et al. Cyclooxygenase-1, but not-2, is upregulated in NB4 leukemic cells and human primary promyelocytic blasts during differentiation [J]. Leukemia, 2004, 18(8): 1373-1379.

[12] Kagawa S, Gu J, Swisher SG, et al. Antitumor effect of adenovirus-mediated BAX gene transfer on p53-sensitive and p53-resistant cancer lines[J]. Cancer Res, 2000, 60(5): 1157-1161.

[13] Tsujii M, Dubois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2[J]. Cell, 1995, 83(3): 493-501.

[14] Lliu XH, Yao S, Kirschenbaum A, et al. NS-398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and downregulates bcl-2 expression in LNCaP cell[J]. Cancer Res, 1998, 58(19): 4245-4249.

[15] 张广森, 刘定胜. 选择性 COX-2 抑制剂 celecoxib 对 K562 细胞的增殖抑制、凋亡诱导作用和分子机制[J]. 生物化学与生物物理进展, 2004, 31(12): 1058-1060.

(收稿日期: 2014-01-23)