

胸腺五肽及其衍生肽的杀菌活性研究^Δ

谢婷*,陶廷婷,梁宁生[#](广西医科大学附属肿瘤医院药学部,南宁 530021)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)28-3918-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.28.10

摘要 目的:研究胸腺五肽及其衍生肽的杀菌活性。方法:采用琼脂铺板计数法测定胸腺五肽[精氨酸(R)-赖氨酸(K)-天冬氨酸(D)-缬氨酸(V)-酪氨酸(Y),RKDVY]及其衍生肽1[RKN(天冬酰胺,N)VY]、衍生肽2(RKKVY)对革兰阴性(G⁻)菌(变形杆菌、大肠埃希菌)和革兰阳性(G⁺)菌(金黄色葡萄球菌、粪肠球菌)的杀菌活性,其中五肽剂量为15.625~1 000 μg/ml,细菌数为10² CFU。结果:3种五肽对G⁻菌均有杀菌活性,且RKKVY、RKNVY杀菌活性强于RKDVY($P<0.01$),RKKVY与RKNVY间差异无统计学意义($P>0.05$);对G⁺菌亦有杀菌活性,其杀菌活性由强到弱依次为RKKVY>RKNVY>RKDVY($P<0.01$)。结论:胸腺五肽及其衍生肽对G⁻菌和G⁺菌均有杀菌活性,具有量效关系。

关键词 胸腺五肽;衍生肽;杀菌活性;天冬氨酸;天冬酰胺;赖氨酸

Study on Bactericidal Activity of Thymopentin Peptide and Its Derived Peptides

XIE Ting, TAO Ting-ting, LIANG Ning-sheng (Dept. of Pharmacy, the Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the bactericidal activity of thymopentin and its derived peptides. METHODS: Agar plate count was adopted to determine the bactericidal activity of thymopentin [arginine (R)-lysine (K)-aspartic acid (D)-valine (V)-tyrosine (Y), RKDVY], its derived peptide 1 [RKN (agedoite, N) VY] and derived peptide 2 (RKKVY) to Gram negative bacterial (*Proteus bacillus vulgaris*, *Escherichia coli*) and Gram positive bacterial (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*). There were 15.625-1 000 μg/ml for peptides, 10² CFU for bacteria. RESULTS: Three pentapeptides possessed bactericidal activity against Gram negative bacteria. The activities of RKKVY and RKNVY were stronger than RKDVY ($P<0.01$), there was no significant difference between RKKVY and RKNVY ($P>0.05$). They also possessed bactericidal activity against Gram positive bacteria, and the activity from strong to weak was RKKVY>RKNVY>RKDVY ($P<0.01$). CONCLUSIONS: Thymopentin and its derived peptides possess bactericidal activity against Gram negative and positive bacteria, with dose-effect relationship.

KEYWORDS Thymopentin; Derived peptides; Bactericidal activity; Aspartic acid; Agedoite; Lysine

胸腺五肽(Thymopentin)是一种免疫调节药,临床上广泛用于免疫力低下等疾病的治疗。胸腺五肽是由胸腺生成素Ⅱ中的5个氨基酸残基组成的肽链片段,位于多肽的第32~36位,拥有和胸腺生成素Ⅱ相同的全部生理功能。其主要作用之一是促进及诱导T细胞分化,提高生物体的免疫功能。当不同的淋巴细胞的量及功能发生改变时,机体就会产生免疫功能失调,使细菌等病原微生物容易侵入机体引起疾病^[1]。胸腺五肽可通过免疫调节而发挥治疗作用,而其是否可以不通过免疫调节而直接杀菌,还从未有过报道。笔者尝试对胸腺五肽的分子结构进行研究。依据前期研究经验,胸腺五肽的分子结构具有抗菌肽的一些结构特点^[2],其氨基酸顺序为精氨酸(Arginine, R)-赖氨酸(Lysine, K)-天冬氨酸(Aspartic acid, D)-缬氨酸(Valine, V)-酪氨酸(Tyrosine, Y)(简称RKDVY)。笔者改变其氨基酸结构衍生出2种衍生肽,希望通过研究RKDVY及其衍生肽的杀菌活性,了解RKDVY是否具有直接的杀菌作用,并初步了解杀菌作用与结构间的关系。

1 材料

Δ 基金项目:广西自然科学基金资助项目(No.2013GXNS-FAA019250);广西医疗卫生重点科研课题(No.重2011075)

* 硕士研究生。研究方向:抗菌蛋白。E-mail:xieting915@163.com

通信作者:教授,博士生导师。研究方向:抗菌蛋白。电话:0771-5332630。E-mail:liangn01@163.com

1.1 仪器

Anke TGL-16C型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);TU-1810S型紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

1.2 药品与试剂

人RKDVY(批号:130408916)、衍生肽1 RKN(天冬酰胺, N)VY(批号:130408915)、衍生肽2 RKKVY(批号:130408914),均由上海波泰生物有限公司合成和纯化,纯度均>95%,每管4 mg;1%小牛血清白蛋白(BSA,批号:A8010)和4-羟乙基哌嗪乙磺酸(Hepes,批号:710B043,纯度>99%)由北京索莱宝科技有限公司提供;LB营养琼脂(北京路桥技术责任有限公司,批号:120919);LB培养基粉[生物工程(上海)有限公司,批号:13052119G];无水CaCl₂(成都科隆化工试剂厂,批号:20081106,纯度≥96%);RPMI-1640培养基(美国Thermo公司,批号:NZD1128)。

1.3 细菌

革兰阴性(G⁻)菌:变形杆菌(ATCC 49027)和大肠埃希菌(ATCC 44113);革兰阳性(G⁺)菌:粪肠球菌(ATCC 32088)和金黄色葡萄球菌(ATCC 26003)。以上标准株均由广西医科大学微生物学教研室提供,购自中国食品药品检定研究院。

2 方法

2.1 溶液的制备

以氨基酸序列为模板,设计合成了RKDVY、衍生肽1 RKNVY和衍生肽2 RKKVY,将其溶解于400 μl灭菌蒸馏水

中,制备成质量浓度为10 g/L的溶液,分装,-20 ℃冷冻保存。每次根据试验需要取出使用,尽量避免反复冻融。3种五肽的一级结构和特性见表1。

表1 3种五肽的一级结构和特性

Tab 1 The primary structure and characteristics of three pentapeptides

一级结构	碱性氨基酸比例, %	净正电荷量
RKDVY	40	+1
RKNVY	40	+2
RKKVY	40	+3

由表1可知,3种五肽都是阳离子肽,RKDVY带有1个正电荷,RKNVY带有2个正电荷,RKKVY带有3个正电荷;RKDVY碱性最强。三者间的不同都发生在第3位的氨基酸上。

2.2 杀菌活性的测定

采用琼脂铺板计数法^[3]。取过夜培养的细菌,按1:50比例加入3 ml新鲜LB培养液,于37 ℃恒温孵育2.5 h(对数生长期);离心收集细菌,并将其沉淀物溶解于0.5 ml灭菌生理盐水中,继以分光光度计于660 nm波长处测定吸光度,记录吸光度达到0.1时所需的细菌浓度,计算细菌稀释倍数。制备RPMI 1640反应体系,含10 mmol/L Hepes、1 mmol/L CaCl₂和1% BSA,pH为7.4。依次将10 μl细菌(终浓度为1×10⁷ CFU/L)和10 μl五肽或生理盐水(对照)加入到80 μl的反应体系中,混匀,置于恒温水浴;2 h后从该体系中取出反应液40 μl,加入360 μl灭菌生理盐水,连续10倍稀释(1 000、250、62.5、15.625 μg/ml),共3次,从每一稀释倍数的稀释液中取出100 μl于无菌培养皿(直径为55 mm)中,再加入6 ml约55 ℃灭菌LB营养琼脂,混匀,凝固,于电热恒温培养箱培养;18~24 h后,计算细菌菌落形成单位(CFU),以对照的CFU在30~300时为可用数据。计算五肽作用后的杀菌率,绘制杀菌曲线,并与对照比较。试验重复5次,计算平均值。杀菌率=(对照CFU-五肽CFU)/对照CFU×100%。

2.3 统计学方法

用SPSS 16.0统计软件,采用*t*检验方法。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $\alpha=0.05, P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对G⁻菌的杀菌活性

3种五肽对G⁻菌的杀菌活性见表2。

表2 3种五肽对G⁻菌的杀菌活性($\bar{x} \pm s, n=5, \%$)

Tab 2 Bactericidal activity of three pentapeptides to G⁻ bacterial($\bar{x} \pm s, n=5, \%$)

五肽	变形杆菌				大肠埃希菌			
	15.625 μg/ml	62.5 μg/ml	250 μg/ml	1 000 μg/ml	15.625 μg/ml	62.5 μg/ml	250 μg/ml	1 000 μg/ml
RKDVY	0	0	16.4±6.8	61.6±10.2	0	0	11.5±4.6	50.6±8.1
RKNVY	0	10.4±5.7*	32.6±7.5*	85.5±7.7*	0	0	20.3±5.2*	75.5±10.2*
RKKVY	0	12.6±4.9*	40.7±9.4*	82.5±9.6*	0	8.3±5.2**	24.7±7.4*	79.6±8.4*

注:与RKDVY比较,* $P<0.01$;与RKNVY比较,** $P<0.01$

Note: vs. RKDVY,* $P<0.01$; vs. RKNVY,** $P<0.01$

由表2可知,当五肽质量浓度为1 000 μg/ml时,RKDVY对变形杆菌和大肠埃希菌的杀菌活性在50%~60%,而RKNVY和RKKVY的杀菌活性在80%左右,均大于RKDVY。与RKDVY比较,62.5、250、1 000 μg/ml的RKNVY和250、1 000 μg/ml的RKKVY的杀菌活性增加;与RKNVY比较,62.5 μg/ml的RKKVY的杀菌活性增加,差异有统计学意义

($P<0.01$)。3种五肽对G⁻菌变形杆菌和大肠埃希菌的杀菌活性的强度依次为RKKVY≈RKNVY>RKDVY。

3.2 对G⁺菌的杀菌活性

3种五肽对G⁺菌的杀菌活性见表3。

表3 3种五肽对G⁺菌的杀菌活性($\bar{x} \pm s, n=5, \%$)

Tab 3 Bactericidal activity of three pentapeptides to G⁺ bacterial($\bar{x} \pm s, n=5, \%$)

五肽	金黄色葡萄球菌				粪肠球菌			
	15.625 μg/ml	62.5 μg/ml	250 μg/ml	1 000 μg/ml	15.625 μg/ml	62.5 μg/ml	250 μg/ml	1 000 μg/ml
RKDVY	0	0	20.5±8.3	37.7±6.9	0	11.6±5.3	27.5±7.1	45.3±8.4
RKNVY	0	12.6±5.8*	33.4±7.1*	72.6±8.3*	0	25.7±6.8*	57.2±7.4*	73.7±6.9*
RKKVY	0	16.7±7.4*	45.6±5.9**	90.2±4.7**	0	22.3±8.5*	67.4±6.7**	87.8±5.3**

注:与RKDVY比较,* $P<0.01$;与RKNVY比较,** $P<0.01$

Note: vs. RKDVY,* $P<0.01$; vs. RKNVY,** $P<0.01$

由表3可知,当五肽质量浓度为1 000 μg/ml时,RKDVY对金黄色葡萄球菌和粪肠球菌的杀菌活性在40%左右,而RKNVY的杀菌活性在70%左右,RKKVY的杀菌活性在90%左右。与RKDVY比较,62.5、250、1 000 μg/ml的RKNVY和RKKVY的杀菌活性增加;与RKNVY比较,250、1 000 μg/ml的RKKVY的杀菌活性增加,差异有统计学意义($P<0.01$)。3种五肽对G⁺菌金黄色葡萄球菌和粪肠球菌的杀菌活性的强度依次为RKKVY>RKNVY>RKDVY。

4 讨论

4.1 胸腺五肽及其衍生肽的设计依据

目前已知的具有杀菌活性的抗菌肽分子都带正电荷^[3]。笔者先对抗菌蛋白——磷脂酶A₂衍生肽的研究中也发现,含有相对较多的碱性氨基酸、带正电荷的衍生肽,杀菌强度往往较强^[2,4-5]。胸腺五肽也带有1个净正电荷量,是碱性较强的肽分子,很有可能具有杀菌活性。因此,笔者根据胸腺五肽的结构,设计和合成了分子肽分子RKDVY、RKNVY和RKDVY,检测其杀菌活性,并了解杀菌活性与结构间的关系。

4.2 胸腺五肽的杀菌作用

以往认为,胸腺五肽是通过调节机体免疫功能发挥作用,是免疫调节药。本研究结果表明,胸腺五肽对于几种临床常见的G⁻和G⁺菌具有杀灭作用,具有量效关系,以往未有相关报道。胸腺五肽同时兼具免疫调节活性和杀菌活性两种重要功能,很可能具有重要的临床应用意义,如第三代头孢菌素类抗菌药——头孢地嗪^[6],兼具广谱抗菌和免疫调节活性双重作用,特别适合用于免疫能力低又有细菌感染的患者。

4.3 胸腺五肽及其衍生肽杀菌活性与结构的关系

在结构上,RKNVY是将胸腺五肽RKDVY第3位的酸性氨基酸D替换成中性氨基酸N,衍生肽的酸性减弱,碱性增加,所带的净正电荷由1变为2。而衍生肽RKKVY则在同样位置将酸性氨基酸D替换成碱性氨基酸K,碱性进一步增加,所带的净正电荷为3,也是3种肽分子中碱性最强的分子。对G⁺菌,碱性最强的RKKVY杀菌活性最强,而碱性居中的RKNVY次之,碱性最弱的RKDVY最弱。而针对G⁻菌时,增加了碱性RKNVY和RKKVY都比RKDVY强,但在RKNVY和RKKVY间没有明显的差别,提示适当增加肽分子的碱性能增强杀菌活性,但进一步增加则活性没有明显的增强。这可能与G⁻菌和G⁺菌之间结构的差异,特别是细菌外膜结构的差异有关。

胸腺五肽作为免疫调节剂在临床已使用多年,其可以通过提高免疫力用于细菌感染性疾病^[7]。本研究结果表明,其还

白芍醇提物及不同极性部位的体外抗氧化作用研究^Δ

秦亚东^{1*},汪荣斌^{1,2},周娟娟³,杨 茜¹(1.安徽中医药高等专科学校药学系,安徽芜湖 241002;2.安徽中药资源研究所,安徽芜湖 241317;3.安徽芜湖市中医医院制剂中心,安徽芜湖 241000)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)28-3920-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.28.11

摘要 目的:研究白芍醇提物(CREt)及不同极性部位的体外抗氧化作用。方法:用95%乙醇制备CREt;分别以石油醚、乙酸乙酯、正丁醇为溶剂,萃取CREt(以50%乙醇制得)得到石油醚部位(CRP部位)、乙酸乙酯部位(CRE部位)、正丁醇部位(CRB部位)和水部位(CRW部位)。考察CREt及不同极性部位对1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(DPPH·)、超氧阴离子自由基(O₂⁻·)、羟基自由基(·OH)清除能力(上述3个实验CREt及不同极性部位的质量浓度范围依次为0.75~12、0.5~6、1.25~15 mg/ml),并与抗坏血酸(VC,0.2 mg/ml)组比较。结果:CREt对DPPH·、O₂⁻·、·OH的最大清除率分别为(97.55±0.25)%、(81.45±0.20)%、(75.28±0.41)%,半数抑制浓度(IC₅₀)分别为1.629、1.789、5.268 mg/ml;CRE部位最大清除率分别为(82.54±0.36)%、(77.74±0.42)%、(72.16±0.73)%,IC₅₀分别为2.481、1.918、6.005 mg/ml;CRB部位对·OH的最大清除率达到(62.53±0.83)%,IC₅₀为7.232 mg/ml,但对DPPH·、O₂⁻·清除率均未超过45%;CRP部位和CRW部位对3种自由基清除率均未超过40%。各部位对3种自由基的清除作用均呈一定的量效关系,但清除作用均不及VC组,差异有统计学意义(P<0.01)。结论:CREt与CRE部位体外抗氧化作用最强,其余部位抗氧化作用较弱。

关键词 白芍;醇提物;极性部位;抗氧化

Study on Antioxidant Activities of Ethanol Extract of *Paeonia lactiflora* and Different Polar Parts *in vitro*

QIN Ya-dong¹, WANG Rong-bin^{1,2}, ZHOU Juan-juan³, YANG Qian¹(1.Dept. of Pharmacy, Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Anhui Wuhu 241002, China; 2.Anhui Institute of Chinese Medicine Resources, Anhui Wuhu 241317, China; 3.Preparation Center, Anhui Wuhu Hospital of TCM, Anhui Wuhu 241000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study antioxidant activities of ethanol extract of *Paeonia lactiflora* (CREt) and different polar parts *in vitro*. METHODS: CREt was prepared with 95% ethanol. CREt (extracted by 50% ethanol) was extracted with aether petrolei, acetic ether and *n*-butyl alcohol to obtain aether petrolei part (CRP part), acetic ether part (CRE part), *n*-butyl alcohol part (CRB part) and water part (CRW part). The ability of CREt and different polar parts eliminating DPPH·, O₂⁻· and ·OH were investigated (mass concentrations of CREt and different polar parts were respectively 0.75-12, 0.5-6, 1.25-15 mg/ml in above 3 tests) and compared with ascorbic acid (VC, 0.2 mg/ml) group. RESULTS: The maximum elimination rate of CREt to DPPH·, ·OH and O₂⁻· were (97.55±0.25)%, (81.45±0.20)% and (75.28±0.41)%, IC₅₀ were 1.629, 1.789 and 5.268 mg/ml; those of CRE part to those radicals were (82.54±0.36)%, (77.74±0.42)% and (72.16±0.73)%, IC₅₀ were 2.481, 1.918 and 6.005 mg/ml; that of CRB part to ·OH reached to (62.53±0.83)%, IC₅₀ was 7.232 mg/ml, but to DPPH·, O₂⁻· were less than 45%; those of CRP part and CRW part to those radicals were all lower than 40%. Each part could eliminate 3 radicals in dose-dependent manner, but were all poorer than VC group, with statistical significance (P<0.01). CONCLUSIONS: The CREt and CRE part show strongest antioxidant activities *in vitro*, and other parts have weak antioxidant effect.

KEYWORDS *Paeonia lactiflora*; Ethanol extract; Polar parts; Antioxidant

具有直接杀菌作用。是否可以将胸腺五肽开发成为具有免疫调节作用和抗菌作用双重功能的药物,就像头孢地嗪一样,值得进一步研究。

参考文献

- [1] 邹自英,朱冰,吴丽娟,等.不同种属细菌感染患者机体免疫功能变化的实验研究[J].实验与检验医学,2011,29(6):605.
- [2] 何睿林,梁宁生.人II A型磷脂酶A₂衍生肽P26抗菌作用与结构修饰的研究[J].中国药理学通报,2011,27(9):1 300.

Δ 基金项目:安徽省高校省级自然科学基金项目(No.KJ2013B114);安徽省高职高专院校专业带头人项目(皖教秘人[2011]2号);安徽中医药高等专科学校校级自然科学基金项目(No.ZRKX1502)

* 讲师,硕士。研究方向:中药及复方药效物质基础。电话:0553-4836123。E-mail:qydy2007@163.com

- [3] Dawgul M, Maciejewska M, Jaskiewicz M, *et al.* Antimicrobial peptides as potential tool to fight bacterial biofilm [J]. *Acta Pol Pharm*, 2014, 71(1):39.
- [4] 陶廷婷,史晓雄,梁宁生.人I型磷脂酶A₂的N末端衍生多肽PLA₂N₁₋₁₅的杀菌活性研究[J].中国药房,2014,25(29):2 709.
- [5] 淳于柳爽,梁宁生.人II A型磷脂酶A₂衍生多肽M17杀菌作用的研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(20):216.
- [6] 龚正华.头孢地嗪对AECOPD患者临床疗效及细胞免疫功能的影响[J].山东医药,2013,53(37):73.
- [7] 杨永明,曹云.胸腺五肽在治疗老年晚期恶性肿瘤伴发肺部感染中的作用[J].中国药物与临床,2013,13(3):379.

(收稿日期:2014-11-22 修回日期:2015-03-10)

(编辑:邹丽娟)