

银杏抗菌肽蛋白基因原核表达及其重组蛋白的体内外抑菌作用研究^Δ

刘 蕾*,何光志#,王文佳(贵州中医药大学基础医学院,贵阳 550025)

中图分类号 R915;Q81 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)18-2513-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.18.12

摘要 目的:获取银杏抗菌肽(GBA)重组蛋白,并考察其体内外抗菌活性,为解决病原菌耐药问题、规模化生产植物源性新型抗菌剂提供实验基础。方法:根据Genebank中公布的GBA基因序列(FJ865399),利用基因技术构建重组质粒pET32a(+)-GBA,再以大肠杆菌原核表达获取重组蛋白,并采用凝胶电泳和Western blotting法对所得蛋白进行纯化及鉴定。采用纸片扩散法考察所获重组蛋白对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、鼠伤寒沙门氏菌的药物敏感性;采用肉汤稀释法测定重组蛋白最小抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC);考察重组蛋白对金黄色葡萄球菌感染模型小鼠的保护作用。结果:成功表达并纯化获得目标重组蛋白(大小约32 kDa)。该重组蛋白对金黄色葡萄球菌中度敏感,对其他3种细菌低度敏感;对金黄色葡萄球菌的MIC为(50.00±5.00)mg/mL、MBC为(138.33±12.58)mg/mL, MIC显著高于其他3种细菌($P<0.05$)。高剂量重组蛋白(8.0 g/kg)能显著降低金黄色葡萄球菌导致的小鼠死亡率($P<0.05$),对小鼠的保护效果与阳性药物青霉素接近。结论:所获重组蛋白对金黄色葡萄球菌的抑制效果明显,对大肠杆菌和绿脓杆菌有一定的抑制作用,对鼠伤寒沙门氏菌抑制作用较弱;该蛋白高剂量给药对金黄色葡萄球菌感染小鼠具有明显的保护作用。

关键词 银杏;抗菌肽;载体质粒;重组蛋白;原核表达;抑菌作用;体内;体外;小鼠

Study on Gene Prokaryotic Expression of *Ginkgo biloba* Antimicrobial Peptide Protein and Antimicrobial Activity of Its Recombinant Protein *in vivo* and *in vitro*

LIU Lei, HE Guangzhi, WANG Wenjia (Basic Medical College, Guizhou University of TCM, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To obtain *Ginkgo biloba* antimicrobial peptide (GBA) recombinant protein, and to investigate *in vivo/in vitro* antimicrobial activity of the protein so as to provide experimental basis for solving bacterial resistance and large-scale production of new plant-derived antimicrobial agents. METHODS: Based on gene technology, according to GBA gene sequence (FJ 865399) published by Genebank, recombinant expression vector plasmid pET32a (+) -GBA was constructed. Prokaryotic expression of recombinant protein was conducted by *Escherichia coli*, and then the protein was purified and identified by gel electrophoresis and Western blotting. Drug sensitivity of obtained recombinant protein to *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* were investigated by Kirby-Bauer test. The minimum antibacterial concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined by broth dilution method. The protective effects of recombinant protein on *S. aureus* infection model mice were investigated. RESULTS: Target recombinant protein was expressed successfully and purified (molecular weight of 32 kDa). The recombinant protein was moderately sensitive to *S. aureus* and low sensitive to other three bacterias. MIC and MBC of the recombinant protein to *S. aureus* were (50.00±5.00)mg/mL and (138.33±12.58)mg/mL, and MIC was significantly higher than those to other 3 kinds of bacterias ($P<0.05$). High-dose of recombinant protein (8.0 g/kg) could significantly reduce the *S. aureus*-induced mortality of mice ($P<0.05$), and had similar protective effect as positive drug penicillin. CONCLUSIONS: Obtained recombinant protein has obvious antimicrobial effects on *S. aureus*, inhibits *E. coli* and *P. aeruginosa* to certain extent and shows poor inhibitive effect on *S. typhimurium*. High-dose of recombinant protein shows significant protective effect for *S. aureus* infection model mice.

KEYWORDS *Ginkgo biloba*; Antimicrobial peptide; Vector plasmid; Recombinant protein; Prokaryotic expression; Antimicrobial effect; *in vivo*; *in vitro*; Mice

近年来,由于抗生素的滥用导致许多耐药菌株出

Δ 基金项目:贵州省教育厅创新群体重大项目(No.黔教合KY字[2016]036);贵州省科技计划课题(No.黔科合中药字[2012]LKZ7024号);贵州省科学技术基金项目(No.黔科合J字[2012]2075号)

* 讲师,硕士。研究方向:中西医结合基础。电话:0851-88308013。E-mail:23583305@qq.com

通信作者:教授,硕士生导师,博士。研究方向:中西医结合基础。电话:0851-88308013。E-mail:392724549@qq.com

现,这对人类生命健康安全构成了巨大威胁,如何解决病原菌对抗生素的耐药问题已迫在眉睫,现已成为生物、医药领域的研究热点。抗菌肽(Antimicrobial peptides),也称为肽类抗生素或天然抗生素,是一类由20~60个氨基酸残基组成,对细菌、真菌等微生物及某些昆虫和植物细胞具有抑制作用的小分子多肽^[1]。从1972年瑞典科学家Boman HG等首次成功分离天蚕素(Cecropin)开始,到目前为止,已发现并分离获得多种具有

抗菌作用的活性多肽,并根据其来源分为哺乳动物抗菌肽、水生动物抗菌肽、两栖类抗菌肽、昆虫抗菌肽、植物抗菌肽和细菌抗菌肽等类别^[2]。已有研究发现,抗菌肽对部分真菌、细菌和病毒具有明显杀伤作用,能促进伤口愈合^[3],其在抗菌领域的应用价值受到了学者的广泛关注,也成为了研究热点。

我国有着丰富的药用植物资源,其中银杏(*Ginkgo biloba* Linn.)在我国种植历史悠久、资源丰富,其药用价值在古代中医典籍中也早有记载。现代研究证实,银杏叶提取物中的银杏酸、银杏酚酸等成分具有一定的抑菌活性^[4-5]。但银杏提取物的抑菌效果受原料来源、温度条件、pH值等因素影响较大,且存在抑菌成分驳杂、分离过程繁琐、产量低、质量难以控制等缺点^[6]。近年来,随着分子生物学等技术的不断发展,深入开发利用中药植物资源成为可能,如刘缙等^[7]从银杏种仁中分离纯化出一种抗菌蛋白,命名为GNK2-1,并证实其对黄瓜镰刀孢菌具有较强的抑制作用;又如荆贝贝^[8]从银杏种仁中分离纯化得到抗菌肽,其对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌以及黄瓜镰刀孢菌等14种真菌均有一定的抑制作用。上述研究主要是从银杏种仁原料中分离得到具有抑菌活性的银杏抗菌肽,但这一过程对植物原料种属及质量等要求高,加之工艺步骤较繁琐、工艺条件要求较高,使得纯化蛋白产量较低。基于此,本研究利用现代分子生物学技术深入开发银杏抗菌多肽,根据Genebank(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中公布的一种具有抑菌活性的银杏抗菌肽(*Ginkgo biloba* antimicrobial peptide, GBA)基因序列(编号:FJ865399),对该抗菌肽进行重组蛋白载体构建,再以大肠杆菌原核表达获取重组蛋白,并考察所得重组蛋白对临床常见致病菌的抑制活性^[8-9],旨在简化抗菌肽的制备环节、实现抗菌肽重组蛋白的规模化生产,为解决病原菌耐药问题、进一步开发利用及规模化生产植物源性新型抗菌剂提供实验基础。

1 材料

1.1 仪器

UV-900S型紫外-分光光度计(上海元析仪器有限公司);PowerPac™ Basic型多功能电泳仪、T100 Thermal Cycle型梯度聚合酶链反应(PCR)仪(美国Bio-Rad公司);TD5A-WS型低速大容量离心机(湖南湘立科学仪器有限公司);CJ-1D型洁净工作台(天津市泰斯特仪器有限公司);Micro 21R型高速离心机、ChemiDoc™ XRS+型凝胶成像仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);EL104型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

1.2 药品与试剂

重组表达质粒pET32a(+)-GBA、TB培养基[吉尔生化(上海)有限公司];M-H培养基(杭州天和微生物试剂有限公司);氨苄青霉素(Amp)、DNA Marker、考马斯亮蓝R250(北京索莱宝科技有限公司);高纯质粒小量制备试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司,批号:00091512);PVDF膜(美国Millipore公司);蛋白Marker

(上海碧云天生物技术有限公司);兔源His标签多克隆抗体(上海博耀生物科技有限公司,批号:SZB0053);羊抗兔辣根过氧化物酶(HRP)标记IgG二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:ZB-2301);Ni-Agarose His标签蛋白纯化试剂盒(包涵体蛋白)(康为世纪生物技术有限公司,批号:00091512);异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)、PH0311细菌细胞总蛋白提取试剂盒、LB培养基、胶回收试剂盒及AEC底物显色试剂盒、十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)试剂[生工生物工程(上海)股份有限公司];其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为无菌蒸馏水。

1.3 动物

健康IR小鼠,雌雄各半,体质量20~22 g,购自重庆腾鑫生物技术有限公司[动物生产合格证号:SCXK(渝)2017-0007]。动物均在环境温度(20±3)℃、湿度(55±5)%的条件下适应性喂养7 d后进行后续实验,期间正常饮食。本实验过程符合动物福利准则。

1.4 菌株

感受/表达态大肠杆菌由吉尔生化(上海)有限公司提供;大肠杆菌(ATCC 35218)、金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)、绿脓杆菌(ATCC 27853)和鼠伤寒沙门氏菌(CMCC 50115)菌株均由贵州中医药大学形态实验室提供。

2 方法

2.1 重组蛋白的合成与鉴定

本课题组参考相关文献^[10-13],委托吉尔生化(上海)有限公司和生物生工(上海)股份有限公司构建重组质粒pET32a(+)-GBA及酶切鉴定,并进行重组质粒的转化、阳性克隆筛选和重组蛋白的表达、纯化及鉴定。

2.1.1 重组质粒构建与酶切鉴定 根据Genebank中公布的GBA序列(编号:FJ865399)的ORF(开放阅读框)序列片段(405 bp),采用Primer Premier 5.0软件设计上下游含限制性内切酶BamH I和Xho I识别位点的序列,利用PCR技术扩增,经1.5%琼脂糖凝胶电泳回收PCR产物。采用BamH I和Xho I酶切PCR产物和表达载体pET32a(+)质粒。回收酶切产物,取5 μL经1%琼脂糖凝胶电泳初步鉴定酶切所得基因片段大小与目标片段一致后,回收纯化酶切产物,并通过T4 DNA连接酶将目的基因序列定向克隆至pET32a(+)质粒的BamH I和Xho I位点,获得重组质粒。

2.1.2 重组质粒转化及阳性克隆筛选 将“2.1.1”项下重组质粒通过冷刺激法转化到感受态大肠杆菌BL21(DE3)菌株中;取已转化菌株,接种至含有100 ng/mL Amp的TB培养基(以下简称“含Amp培养基”)中,于37℃条件下倒置培养12~16 h。对培养所得单菌落进行基因测序,取测序结果证实为阳性的菌株继续培养,提取重组质粒,转化到表达态大肠杆菌Rosetta gami菌株中。转化后的表达菌株进行复苏培养后,取适量,接种至含100 μg/mL Amp、15 μg/mL卡那霉素、34 μg/mL

克林霉素的LB培养基中,于37℃倒置培养至对数生长期,挑取单菌落进行基因测序,检测判断是否转化成功。

2.1.3 重组蛋白的表达 挑取“2.1.2”项下经基因测序证实转化成功的菌株,接种至含Amp的LB培养基,置于100 mL培养瓶中,于37℃下以220 r/min摇床培养过夜。取培养完毕的菌液,按1%的体积比接种至含Amp的LB培养基,于37℃下以220 r/min摇床培养至对数生长期时,加入终浓度为1 mmol/L的诱导剂IPTG,在37℃下诱导蛋白表达3 h。将表达完毕的菌液以5 000 r/min离心5 min,收集沉淀,以磷酸盐缓冲液(pH7.4)重悬菌液,超声(功率:400 W,频率:60 kHz)处理直至细胞破碎,再以12 000 r/min离心30 min,取其上清和沉淀分别进行SDS-PAGE分析后显示,重组蛋白主要存在于沉淀中,表明所得目标蛋白以包涵体形式存在。

2.1.4 重组蛋白的复性与纯化 取“2.1.3”项下包涵体沉淀,采用PH0311细菌细胞总蛋白提取试剂盒提取重组蛋白。将蛋白提取液置于透析袋中,并以复性液作用过夜。取复性完毕后的提取液,在4℃下以13 000 r/min离心15 min,取沉淀重新溶解于含8 mol/L尿素的Binding buffer中,再次采用复性液进行作用,重复操作3次。取复性后的上清液,采用Ni-Agarose His标签蛋白纯化试剂盒过柱纯化。将纯化后的重组蛋白液冷冻干燥,即得。

2.1.5 纯化重组蛋白分子量的测定 取“2.1.4”项下纯化后重组蛋白,加无菌蒸馏水制成质量浓度为0.4 g/mL的溶液,以氢氧化钠调节pH为7.0~7.2,采用SDS-PAGE进行纯度检测及回收。采用Western blotting法,将纯化蛋白转膜并先后加入一抗兔源His-tag抗体(1:3 000)、羊抗兔HRP标记IgG二抗(1:3 000)进行孵育,然后采用AEC底物显色试剂盒进行显色反应,按说明书方法计算重组蛋白分子量。

2.2 重组蛋白的体内外抑菌作用考察

2.2.1 重组蛋白对4种常见细菌的药物敏感度考察 参考文献方法^[14-16]并加以改良,采用纸片扩散法进行体外药敏试验。取“2.1.4”项下所得纯化重组蛋白,以无菌蒸馏水制成质量浓度为0.4 g/mL的溶液,将6 mm圆形定性滤纸片在该溶液中浸泡2 h,烘干,制成药敏纸片,备用;另同法以无菌生理盐水浸泡滤纸,制成阴性对照纸片。取大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌和鼠伤寒沙门氏菌菌株,接种于无选择性的LB琼脂培养基上,于37℃下孵育过夜后,挑取菌落适量,加入生理盐水,混匀,得 $5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ CFU/mL的菌悬液。取上述菌悬液,分别均匀涂于M-H培养基平板,每个平板贴2片重组蛋白药敏纸片和1片阴性对照纸片,于37℃下培养16 h后,测量抑菌环直径。按抑菌圈直径判断药物敏感度:抑菌圈直径>20 mm者为极度敏感,15~20 mm者为高度敏感,10~14 mm者为中度敏感,>0~<10 mm者为低度敏感,0 mm者为无敏感性^[17]。每种菌株平行测定3次。

2.2.2 重组蛋白对4种常见细菌的最小抑菌浓度(MIC)

和最低杀菌浓度(MBC)测定 参照文献方法^[18-20],采用肉汤稀释法进行测定。取“2.1.4”项下所得纯化重组蛋白,在96孔板中采用M-H液体培养基倍比稀释,每孔加入“2.2.1”项下4种菌悬液各0.01 mL,作为给药组;同时设置不加菌液、只加入相应不同质量浓度的重组蛋白溶液孔作为空白对照组。各组细胞在37℃培养18 h后,采用紫外分光光度计在550 nm波长处测定吸光度。以给药组培养孔未出现混浊变化、且吸光度值与空白对照比较无明显差异所对应的最高药物浓度作为该重组蛋白对上述各细菌的MIC^[17]。另吸取给药组培养液0.01 mL至LB培养基平板,于37℃下培养18 h后,以平板上无任何菌落生长对应的最低药物浓度作为该重组蛋白对上述各细菌的MBC^[18]。每种菌株平行测定3次。

2.2.3 重组蛋白对金黄色葡萄球菌感染模型小鼠的保护作用考察 根据体外抑菌考察结果,以金黄色葡萄球菌为对象,参照文献方法^[19-20]确定其对小鼠的100%致死剂量(100%MLD)。取金黄色葡萄球菌,在M-H平板上于37℃培养6 h,取菌落适量,研磨,加入生理盐水制成浓度约为 10×10^9 、 5×10^9 、 2.5×10^9 个/mL的菌悬液,然后按每100 mL菌悬液加入酵母5 mg,混匀。取健康小鼠30只,随机分为3组,每组10只,分别腹腔注射上述含酵母的不同浓度菌悬液(0.5 mL/只)。每日观察小鼠死亡情况,确定金黄色葡萄球菌对小鼠的100%MLD约为 10×10^9 个/mL^[21]。

参照文献方法^[19-21]考察重组蛋白对金黄色葡萄球菌感染模型小鼠的保护作用。取小鼠60只,随机分为空白对照组、细菌对照组、阳性药物组(青霉素,0.98 g/kg^[21])和重组蛋白低、中、高剂量组(2.0、4.0、8.0 g/kg,参照阳性药物的临床剂量换算制定,其中重组蛋白的高剂量与阳性药物临床用药量较为接近),每组10只。各组小鼠实验前均禁食16 h,然后灌胃相应药液(20 mL/kg,青霉素或重组蛋白均以生理盐水配制),空白对照组和细菌对照组小鼠灌胃等体积生理盐水,每日1次,连续给药7 d。在第7天给药30 min后,除空白对照组外,其余各组小鼠腹腔注射浓度约为 10×10^9 个/mL(即100%MLD,以生理盐水配制)的金黄色葡萄球菌菌液(0.5 mL/只),继续给药,每日1次,连续5 d。观察并记录感染5 d内的小鼠死亡情况,以死亡率来评价对金黄色葡萄球菌感染模型小鼠的保护作用^[20-21]。实验重复3次。

2.3 统计学方法

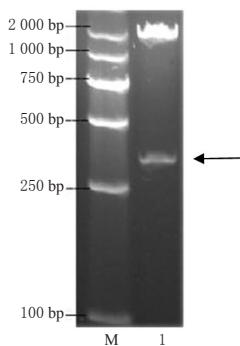
采用SPSS 13.0软件对数据进行统计分析。计数资料以例数或率表示,组间比较采用 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 重组质粒的鉴定结果

对重组质粒经BamH I和Xho I进行双酶切后,其产物经1%琼脂糖凝胶后显示,在250~500 bp处有明显条带(见图1箭头处),与预期插入的目的基因片段(405

bp)大小接近,表明成功获得目标重组质粒,详见图1(注:重组表达质粒电泳图最上方条带是切下的载体片段,下方条带是目的片段)。



注:M. DNA Marker; 1. 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切的重组质粒

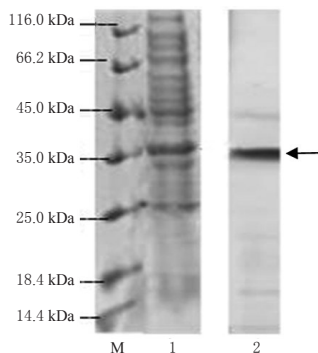
Note: M. DNA Marker; 1. recombinant plasmid digested by *Bam*H I and *Xho* I

图1 pET32a(+)-GBA 重组质粒双酶切鉴定电泳图

Fig 1 Double enzyme digestion identification electrophoresis of pET32a(+)- GBA recombinant plasmid

3.2 重组蛋白的鉴定结果

所得重组蛋白(包涵体蛋白形式)经 SDS-PAGE 电泳和 Western blotting 法分析其表达蛋白和转膜回收蛋白后显示,在近 35 kDa 处均出现一条明显的条带(见图2箭头处),与预期基因序列表达蛋白分子量(14.5 kDa)和 pET32a 上标签表达蛋白的分子量(17 kDa)之和(约 32 kDa)接近,表明成功获得目标重组蛋白,详见图2。



注:M.蛋白 Marker; 1.表达蛋白(SDS-PAGE 法获得); 2.转膜回收蛋白(Western blotting 法获得)

Note: M. protein marker; 1. expressed protein (by SDS-PAGE); 2. recovered protein by transfer membrane (by Western blotting)

图2 目的蛋白鉴定电泳图

Fig 2 Electrophoresis of purpose protein identification

3.3 重组蛋白对4种常见细菌的药物敏感度检测结果

重组蛋白对金黄色葡萄球菌为中度敏感,对大肠杆菌、绿脓杆菌和鼠伤寒沙门氏菌均为低度敏感。重组蛋白对4种常见细菌的药敏试验结果见表1。

3.4 重组蛋白对4种常见细菌的MIC和MBC测定结果

重组蛋白对金黄色葡萄球菌的MIC值显著低于其他3种细菌,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示其对金

黄色葡萄球菌的抑制活性最明显。重组蛋白对4种常见细菌MIC和MBC的测定结果见表2(注:“无杀菌作用”是指各剂量组的细胞孔均有细菌生长)。

表1 重组蛋白对4种常见细菌的药敏试验结果($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab 1 Drug sensitivity test results degree of recombinant protein to 4 kinds of common bacteria ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

菌种	抑菌圈直径, mm	敏感度
金黄色葡萄球菌	11.38 ± 0.63	中度
绿脓杆菌	6.04 ± 0.26	低度
大肠杆菌	7.52 ± 0.55	低度
鼠伤寒沙门氏菌	4.01 ± 0.74	低度

表2 重组蛋白对4种常见细菌MIC和MBC的测定结果($\bar{x} \pm s$, $n=3$, mg/mL)

Tab 2 Determination results MIC and MBC of recombinant protein to 4 kinds of common bacteria ($\bar{x} \pm s$, $n=3$, mg/mL)

菌种	MIC	MBC
金黄色葡萄球菌	50.00 ± 5.00	138.33 ± 12.58
绿脓杆菌	201.67 ± 7.64*	-
大肠杆菌	121.67 ± 10.41*	-
鼠伤寒沙门氏菌	245.00 ± 5.00*	-

注:与金黄色葡萄球菌比较, * $P < 0.05$; “-”表示无杀菌作用

Note: vs. *Staphylococcus aureus*, * $P < 0.05$; “-” means no sterilization effect

3.5 重组蛋白对金黄色葡萄球菌致小鼠死亡的影响

与空白对照组比较,细菌对照组小鼠死亡率显著升高,达到100%,差异有统计学意义($P < 0.01$);与细菌对照组比较,阳性药物组和重组蛋白高剂量组小鼠死亡率均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),且两组组间差异无统计学意义($P > 0.05$);而重组蛋白中、低剂量组小鼠死亡率与细菌对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组小鼠死亡率比较见表3。

表3 各组小鼠死亡率比较($n=10$)

Tab 3 Comparison of mortality of mice in each group ($n=10$)

组别	剂量, g/kg	死亡例数, 只	死亡率, %
空白对照组		0	0
细菌对照组		10	100**
阳性药物组	0.98	4	40 [#]
重组蛋白低剂量组	2.0	9	90
重组蛋白中剂量组	4.0	8	80
重组蛋白高剂量组	8.0	5	50 [#]

注:与空白对照组比较, ** $P < 0.01$; 与细菌对照组比较, [#] $P < 0.05$

Note: vs. blank control group, ** $P < 0.01$; vs. bacteria control group, [#] $P < 0.05$

4 讨论

在我国,银杏的药用价值早有记载。明代李时珍的《本草纲目》中载银杏有:“熟食温肺、益气、定喘嗽、缩小便、止白浊;生食降痰、消毒杀虫”之效。清代张璐的《本经逢源》中载银杏果,又称白果,有降痰、清毒、杀虫

之功能,可治疗“疮疥疽瘤、乳痈溃烂、牙齿虫龋、小儿腹泻、赤白带下、慢性淋浊、遗精遗尿等症”。现代研究也证实,银杏内含有的银杏黄酮、银杏内酯、银杏多糖、白果酸、果仁蛋白等多种生物活性物质,具有抑菌、防治心脑血管疾病、对抗血小板活化因子、预防老年痴呆、抗炎及抗肿瘤等作用^[22]。已有报道显示,银杏中含有抗菌肽,如荆贝贝^[1]通过提取银杏种仁的总RNA,通过建立反转录体系表达纯化得到具有抗菌和真菌作用的活性蛋白;高宁宁^[23]将银杏种仁抗菌肽基因 *Gnk2-1* 转化甜瓜和西瓜的研究也提示其可增强植物的抗菌能力。

已有研究证实,抗菌肽与微生物的相互作用机制是通过抗菌肽所带正电荷残基与微生物细胞膜表面负电荷静电相互吸引结合后,与细胞膜发生相互作用而破坏细胞膜完整性^[24],而原核细胞和真核细胞膜间的电荷区别正是抗菌肽能选择性作用于微生物,而对真核细胞几乎无毒性或低毒性、不易造成耐药的重要原因之一。抗菌肽的抗菌谱广、起效快速、不易产生蓄积中毒,因此可用于食品防腐、农业生产、愈合剂等,并有望成为新一代的抗菌、抗病毒药物,有广泛的开发应用前景^[25]。然而,天然抗菌肽的来源少、分离提取成本高,无法满足基础研究及临床使用需求,而利用DNA重组技术开发稳定性更高、杀菌活性更强、杀菌谱更广、毒副作用更小的抗菌肽逐渐成为关注热点^[26]。本研究通过人工合成GBA基因序列,将其插入pET32a(+)表达载体后再以大肠杆菌进行诱导表达,获得了重组蛋白(分子量约32 kDa)。对该重组蛋白进行体外药敏试验和MIC/MBC的测定后显示,其对金黄色葡萄球菌的抑制效果明显,对大肠杆菌和绿脓杆菌有一定的抑制作用,对鼠伤寒沙门氏菌抑制作用较弱;在小鼠体内实验结果显示,该重组蛋白高剂量给药能显著降低金黄色葡萄球菌感染导致的小鼠死亡率,且与抗生素青霉素的效果比较差异无统计学意义;而中、低剂量重组蛋白给药对小鼠的保护作用不明显。考虑到抗菌肽抑菌机制主要是通过与细胞膜结合引起膜破损而发挥作用,故细胞膜的不同组成对抗菌肽的活性和选择性毒性有很大影响,且抗菌肽在细胞膜上形成孔的能力主要与抗菌肽的浓度和环境pH值有关^[27-30],因此笔者认为这也是本研究所测得重组蛋白对不同菌种的体外抑菌效果有所不同、高剂量给药对金黄色葡萄球菌感染小鼠的保护作用更强的原因所在。

本研究由于受试菌种较少,故尚未充分明确其对革兰氏阴性或阳性菌抑制作用的抗菌谱。同时,由于抗菌肽的抗菌活性与肽分子的空间结构密切相关,体外合成的抗菌肽与天然抗菌肽虽然一级结构一致,但空间结构却不尽相同,因此活性可能存在差异;此外,还存在可引起宿主细胞发生“自杀”而导致抗菌肽产量低的现象^[31]。后续研究中,本课题组拟对GBA基因采用真核表达获取蛋白,与大肠杆菌原核表达所获重组蛋白以及银杏中天然抗菌蛋白的活性进行比较;同时,采用更多表达载体进行考察,探寻更合适的载体用于后续重组蛋白的规模

化生产,为新型抗菌剂的开发奠定基础。

参考文献

- [1] 荆贝贝.银杏种仁抗菌肽的分离纯化、性质鉴定及其总RNA提取[D].杨凌:西北农林科技大学,2006.
- [2] 郑加兰.抗菌肽的研究与应用[J].江西饲料,2010(1):14-18.
- [3] HOFFMANN JA, HETRU C. Insect defensive: inducible antibacterial peptide [J]. *Immunol Today*, 1992, 13(10): 411-415.
- [4] 杨小明,叶允荣,王萍,等.银杏叶提取物和银杏酸的抗菌活性研究[J].食品科学,2004,25(4):68-71.
- [5] 曾献,龚玉子,王焕娇.银杏叶的药理作用[J].湖南林业科技,2008,35(1):6-8.
- [6] 曲晓华,辛玉峰.银杏提取物抑菌效果的研究[J].黑龙江农业科学,2008,31(1):25-26.
- [7] 刘缙,王亚红,王强,等.银杏果仁抗菌蛋白的分离纯化及其基因克隆和原核表达初步研究[J].农业生物技术学报,2010,18(2):246-253.
- [8] 谢坤,谭玉婷,王靖,等.家蚕抗菌肽基因BmCecropinD的克隆及重组蛋白的自诱导表达[J].动物医学进展,2018,39(5):13-17.
- [9] GAVIT P, BETTER M. Production of antitungal recombinant peptides in *Escherichia coli*[J]. *J Biotechnol*, 2000, 79(2):127-136.
- [10] APIWATTANAKUL N, THOMAS PG, KUHN RE, et al. Helminth infections predispose mice to pneumococcal pneumonia but not to other pneumonic pathogens[J]. *Med Microbiol Immunol*, 2014, 203(5):357-364.
- [11] PENG L, XU Z, FANG X, et al. High-level expression of soluble human defensin-2 in *Escherichia coli*[J]. *Process Biochem*, 2004, 39(12):2199-2205.
- [12] RAO X, HU J, LI S, et al. Design and expression of peptide antibiotic hPAB- β as tandem muhimers in *Escherichia coli*[J]. *Peptides*, 2005, 26(5):721-729.
- [13] MOON JY, HENZLER-WILDMAN KA, RAMAMOORTHY A. Expression and purification of a recombinant LL-37 from *Escherichia coli*[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1758(9):1351-1358.
- [14] 李珍,李从荣.细菌快速药敏试验方法研究进展[J].检验医学与临床,2016,13(8):1142-1144.
- [15] 谭瑶,赵清,舒为群,等.K-B纸片扩散法药敏试验[J].检验医学与临床,2010,7(20):2290-2291.
- [16] 王辉,徐英春,陈民钧.简要介绍美国NCCLS药敏试验纸片扩散法法规(1993年12月版)[J].中华医学检验杂志,1995,18(1):60-62.
- [17] 李国旺,苗志国,赵恒章.大黄的体外抑菌实验[J].光谱实验室,2011,28(1):67-68.
- [18] 李汉浞,任赛赛,李勇,等.枫杨萜醌对常见菌的抗菌谱、最低抑菌浓度和最低杀菌浓度研究[J].时珍国医国药,2012,23(6):1422-1424.
- [19] 刘富来,冯翠兰.1株产肠毒素金黄色葡萄球菌致死小鼠的初步研究[J].中国动物检疫,2010,27(4):50-51.
- [20] 秦文艳,赵金明,齐越,等.射干提取物体内体外抑菌作用

5味山姜属中药不同极性部位对胃溃疡寒证模型大鼠交感神经-肾上腺系统机能的影响^A

柳俊辉*, 丘海冰, 谢 鹏, 苏善美, 李明芳, 陈俊其, 尹 优, 秦华珍[#](广西中医药大学药学院, 南宁 530200)

中图分类号 R285.5;R-332 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)18-2518-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.18.13

摘 要 目的:探讨高良姜、大高良姜、红豆蔻、草豆蔻、益智等5味山姜属中药不同极性部位对胃溃疡寒证大鼠交感神经-肾上腺系统机能的影响。方法:取SD大鼠,均灌胃4℃知母水煎液、冰醋酸溶液复制胃溃疡寒证模型,并于造模后随机分为模型组、附子理中丸组(阳性对照,9.0 g/kg)、西咪替丁组(阳性对照,0.003 3 g/kg)以及5种中药石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、水萃取部位低、高剂量组(以下简称“高石低/高”“大石低/高”“红石低/高”“草石低/高”“益石低/高”“高乙低/高”“大乙低/高”“红乙低/高”“草乙低/高”“益乙低/高”“高正低/高”“大正低/高”“红正低/高”“草正低/高”“益正低/高”“高水低/高”“大水低/高”“红水低/高”“草水低/高”“益水低/高”,剂量分别为0.064/0.256、0.032/0.128、0.008/0.032、0.075/0.3、0.1/0.4、0.064/0.256、0.108/0.432、0.16/0.64、0.064/0.25、0.125/0.5、0.056/0.224、0.108/0.432、0.08/0.32、0.2/0.8、0.3/1.2、0.14/0.56、0.032/0.128、0.028/0.112、0.05/0.2、0.087/0.348 g/kg,以萃取部位质量计),每组10只;另设空白组(常温水)。造模次日,空白组和模型组大鼠均灌胃等容常温水,各给药组大鼠灌胃相应药液2 mL/100 g, q12 h,共给药4次。末次给药后,采用酶联免疫吸附测定法检测各组大鼠尿液中17-羟皮质类固醇(17-OHCS)和儿茶酚胺类(CAs)物质[肾上腺素(A)、去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)]以及血清中促肾上腺皮质激素(ACTH)、多巴胺-β-羟化酶(D-β-H)的含量。结果:与空白组比较,模型组大鼠尿液中17-OHCS、A、NE、DA以及血清中ACTH、D-β-H含量均显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,不同给药组大鼠尿液17-OHCS(附子理中丸组、西咪替丁组以及高石低/高、大石高、红石高、草石高、益石高组,5种药材乙酸乙酯部位各剂量组,大正高、红正高、草正高、益正高组,高水高、大水高、红水高组)、A(附子理中丸组、西咪替丁组以及高石高、大石高、红石低/高、草石低/高、益石高组,5种药材乙酸乙酯部位各剂量组,高正高、大正高、红正低/高、草正高、益正高组,红水高组)、NE(附子理中丸组、西咪替丁组,5种药材石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位各剂量组,以及高水高、大水高、红水高组)、DA[附子理中丸组、西咪替丁组,5种药材石油醚部位各剂量组(除高石低外),乙酸乙酯部位各剂量组,以及高正高、大正高、红正高、草正高、益正高组,红水高组]含量和血清ACTH[附子理中丸组,5种药材石油醚部位各剂量组(除高石低、大石低、草石低组外)、乙酸乙酯部位各剂量组(除大乙低、红乙低组外)、红正高组、大水高组]、D-β-H[附子理中丸组以及高石高、大石高、红石低/高、益石高组,5种药材乙酸乙酯部位各剂量组(除大乙低、红乙低、益乙低组外),大正高、红正高组,红水高组]含量均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);且大石高组17-OHCS、D-β-H含量,草石高组ACTH、D-β-H含量以及高石高、益石高组D-β-H含量均显著低于红石高组;高乙高、草乙高、益乙高组DA含量以及高乙高、红乙高、草乙高、益乙高组D-β-H含量均显著低于大乙高组,高乙高、草乙高组DA含量均显著低于红乙高组,高乙高、大乙高、草乙高、益乙高组ACTH含量均显著高于红乙高组;高正高、大正高、草正高、益正高组17-OHCS、DA、ACTH含量,大正高、草正高、益正高组A含量,高正高、草正高、益正高组D-β-H含量均显著低于红正高组;草水高、益水高组17-OHCS、D-β-H含量均显著低于大水高组;草水高、益水高组17-OHCS、DA、D-β-H含量和高水高组DA、D-β-H含量

的研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(4):147-150.

[21] 林海,龚又明,邓广海.黄柏及其炮制品水提物体内、外抑菌作用研究[J].中国药房,2012,23(31):2900-2902.

[22] 吴黎,欧紫,刘蕾.银杏抗菌作用研究进展[J].健康之路,2018,17(10):22.

[23] 高宁宁.银杏抗菌肽基因Gnk2-1转化甜瓜和西瓜的研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2011.

[24] 单安山,马得莹,冯兴军,等.抗菌肽的功能/研发与应用[J].中国农业科学,2012,45(11):2249-2259.

[25] 赵娟,张东玲,武果桃,等.抗菌肽药物的研究进展及应用

前景[J].养猪,2015,8(1):20-210.

[26] 申吉泓,杨宇如,唐孝达.抗菌肽作用机制研究现状[J].国外医学肿瘤学分册,2003,30(5):347-350.

[27] 张宇,姜宁,张爱忠.抗菌肽抑菌机理及其研究方法[J].现代畜牧兽医,2018,47(1):52-57.

[28] 彭冉,毛文超,赵立岭,等.抗菌肽与细胞膜相互作用机制的分子动力学模拟研究[J].德州学院学报,2014,30(6):14-20.

[29] 杨涛,杨晓喻,刘长虹.抗菌肽抗菌机制及研究方法的研究进展[J].口腔颌面修复杂志,2015,16(2):111-115.

[30] 黄现青,高晓平,赵改名,等.抗菌肽抑菌机制研究进展[J].生物学杂志,2010,27(2):62-66.

[31] 韦岩.抗菌肽的研究进展和临床应用[J].菏泽医学专科学校学报,2007,19(1):76-78.

^A 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81360646);广西壮族自治区科学技术厅广西重点实验室建设项目(No.17-259-20)

* 副教授,博士。研究方向:中药理论及药效学。E-mail:451947085@qq.com

[#] 通信作者:教授,博士生导师,博士。研究方向:中药药性、物质基础及效用。E-mail:937824429@qq.com

(收稿日期:2019-04-10 修回日期:2019-07-28)
(编辑:段思怡)