

# 人 I 型磷脂酶 A<sub>2</sub> 的 N 末端衍生多肽 PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub> 的杀菌活性研究<sup>△</sup>

陶廷婷\*, 史晓雄, 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;R977 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)29-2709-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.29.07

**摘要** 目的:观察人 I 型磷脂酶 A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)的 N 末端衍生多肽 PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub> 对不同细菌的体外杀菌活性。方法:以人 I 型 PLA<sub>2</sub> N 末端的 15 个氨基酸残基为模板,合成多肽 PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub>。采用琼脂铺板计数法,记录并计算不同质量浓度(1 000、250、62.5、15.625 μg/ml)的 PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub> 对革兰阳性(G<sup>+</sup>)菌(金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、枯草芽孢杆菌)和革兰阴性(G<sup>-</sup>)菌(大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、变形杆菌)的杀菌率。结果:15.625、62.5、250、1 000 μg/ml 的 PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub> 对 G<sup>+</sup> 菌的杀菌率分别为 10%~19%、36.55%~89.73%、83%~100%、96%~100%,对 G<sup>-</sup> 菌的杀菌率分别为 8.86%~22.63%、21.61%~40.55%、40%~83%、87%~93%。结论:高浓度 PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub> 对 G<sup>+</sup> 和 G<sup>-</sup> 均具有较强的杀菌活性,特别是对 G<sup>+</sup>。

**关键词** I 型磷脂酶 A<sub>2</sub>; N 末端衍生肽; PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub>; 杀菌活性

## Study on Bactericidal Activity of the Polypeptide Derived from N-terminal Sequence of Human Group I Phospholipase A<sub>2</sub>

TAO Ting-ting, SHI Xiao-xiong, LIANG Ning-sheng (Dept. of Pharmacy, The Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To observe the bactericidal activity of the polypeptide derived from N-terminal sequence of human type I phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub>) *in vitro*. METHODS: PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub> was synthesized according to 15 amino acid sequence from N-terminal of human type I PLA<sub>2</sub>. The sterilizing rate of different concentrations of PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub> (1 000, 250, 62.5, 15.625 μg/ml) to Gram-positive bacteria (including *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*) and Gram-negative bacteria (including *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus bacillus vulgaris*) were calculated and recorded by agar plate colony counting. RESULTS: The sterilizing rates of 15.625, 62.5, 250 and 1 000 μg/ml PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub> to Gram-positive bacteria were 10%-19%, 36.55%-89.73%, 83%-100% and 96%-100%, respectively; those to Gram-negative bacteria were 8.86%-22.63%, 21.61%-40.55%, 40%-83% and 87%-93%, respectively. CONCLUSIONS: High concentration of PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub> possesses strong bactericidal activity to Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria, particular to Gram-positive bacteria.

**KEYWORDS** Type I phospholipase A<sub>2</sub>; N-terminal derived peptide; Phospholipase A<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub>; Bactericidal activity

抗菌肽(Antimicrobial peptides, AMPs)是一类具有杀菌活性的肽的总称,其广泛存在于生物界,是生物抵抗病原微生物入侵的重要防御分子,属于生物先天免疫的重要部分,极具开发潜力<sup>[1]</sup>。有研究者将具有杀菌活性的蛋白分子(如人乳铁蛋白)作为模板,设计并合成出比模板分子小很多的多肽,但仍具有杀菌活性,由于这些衍生肽具有更好的安全性、稳定性和较低的生产成本,有的研究已经取得突破性进展,目前已经进入了临床试验阶段<sup>[2]</sup>。

磷脂酶 A<sub>2</sub>(Phospholipase A<sub>2</sub>, PLA<sub>2</sub>)是一类能够水解磷脂 sn-2 键的酶,根据其结构特点可分为多种亚型。其中 I 型 PLA<sub>2</sub> 来源于哺乳动物的胰腺,主要作用是消化食物中的磷脂,不具有杀菌活性<sup>[3]</sup>;而 II 型 PLA<sub>2</sub> 存在于哺乳动物的多种组织和细胞中,具有很强的杀菌活性。虽然 I 型 PLA<sub>2</sub> 分子并无杀菌活性<sup>[4]</sup>,但由于其 N 末端顺序与具有杀菌活性的 II 型 PLA<sub>2</sub> 分子

类似,因此本研究以人 I 型 PLA<sub>2</sub> 的 N 末端为模板合成了多肽分子 PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub>,并对其是否具有杀菌活性进行了初步分析。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

Tu-1810S 紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);Delta 320 pH 计(北京北方伟业发展有限公司)。

#### 1.2 药品与试剂

PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub>(上海波泰生物有限公司合成,批号:13040895,纯度:95%);小牛血清白蛋白(美国 Sigma 公司,批号:808A051)和 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(Hepes,美国 Amresco 公司,批号:710B043)均由北京索莱宝科技有限公司分装;胆盐乳糖(LB)培养基粉[生物工程(上海)有限公司,批号:12091521G];LB 营养琼脂(北京路桥技术责任有限公司,批号:120919);无水 CaCl<sub>2</sub>(成都科隆化工试剂厂,批号:20081106);RPMI-1640 反应体系(美国 Thermo 公司,批号:NXM0761)。

#### 1.3 细菌

革兰阳性(G<sup>+</sup>)菌:金黄色葡萄球菌(ATCC26003)、粪肠球菌(ATCC32088)、枯草芽孢杆菌(ATCC63501);革兰阴性(G<sup>-</sup>)菌:大肠埃希菌(ATCC44113)、变形杆菌(ATCC49027)、铜绿

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

\* 硕士研究生。研究方向:抗菌蛋白。电话:0771-5332630。E-mail:liupangshui1988@sina.com

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

假单胞菌(ATCC10104)。以上标准菌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 人 I 型 PLA<sub>2</sub> 氨基酸顺序(蛋白质一级结构)的获取

利用美国国家生物工程信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)网站的基因库(GenBank)进行查询,获取 I 型 PLA<sub>2</sub> 蛋白分子 N 末端第 1~15 个氨基酸顺序 AVWQFRKMIKCVIPG(A:丙氨酸, V:缬氨酸, W:色氨酸, Q:谷氨酰胺, F:苯丙氨酸, R:精氨酸, K:赖氨酸, M:甲硫氨酸, I:异亮氨酸, C:半胱氨酸, P:脯氨酸, G:甘氨酸)。

### 2.2 多肽的设计、合成、配制及保存

以“2.1”项获取的人 I 型 PLA<sub>2</sub> 氨基酸顺序的 N 末端 15 个氨基酸残基为模板,由上海波泰生物有限公司合成多肽。合成纯度均为 95%,每管 4 mg,溶于经高压蒸汽灭菌的双蒸水 400 μl 中,即得 10 mg/ml 的多肽溶液;以每管 20 μl 分装于 500 μl Ependorf 管中, -20 °C 冷冻保存,尽量避免反复冻融。

### 2.3 结构预测

利用软件 weixiang (www.jci-bioinfo.cn/wenxiang2) 预测 PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub> 的结构。按要求输入待测氨基酸顺序后得出预测图。

### 2.4 杀菌试验<sup>[4]</sup>

采用琼脂铺板计数法。取过夜培养的细菌,按 1:50 分别加入至 3 ml 新鲜 LB 培养液中(铜绿假单胞菌加入量为 100 μl,其他菌加入量为 60 μl),置于 37 °C 振荡培养 2.5 h,达对数生长期。采用台式离心机收集、洗涤细菌并将其沉淀物溶解于 500 μl 生理氯化钠溶液中,再以紫外分光光度计于 540 nm 波长处检测吸光度达 0.1 OD 时所需的含菌量(μl),计算细菌稀释倍数。用生理氯化钠溶液配制菌悬液,稀释至含菌量为 1×10<sup>9</sup> CFU/L。吸取不同浓度多肽和菌悬液各 10 μl,加入 RPMI-1640 反应体系(总体积为 100 μl,含有 0.01 mmol/L Hepes、小牛血清白蛋白、0.01 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, pH 为 7.4),混匀后置于 37 °C 水浴 2.5 h,多肽作用质量浓度为 1 000、250、62.5、15.625 μg/ml。水浴 2.5 h 后,从该反应体系中取出反应液 40 μl,加入灭菌生理氯化钠溶液 360 μl,连续 10 倍稀释,共 3 次。取每一稀释倍数稀释液 100 μl 至无菌培养皿中,再加入经灭菌后 55 °C 保温的 LB 营养琼脂约 5 ml,摇匀,待琼脂冷却后,将培养皿放入 37 °C 温箱培养,18~24 h 后取出计算细菌含菌量和经不同浓度多肽作用后的杀菌率。杀菌率=(原含菌量-杀菌后含菌量)/原含菌量×100%。每组试验重复 5 次。

### 2.5 统计学方法

利用 SPSS16.0 软件,采用方差分析就 PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub> 对 G<sup>+</sup> 菌及 G<sup>-</sup> 菌的杀菌活性进行差异性分析。计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub> 的结构特点

PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub> 由 15 个氨基酸残基组成,顺序为 AVWQFRKMIKCVIPG,含有 3 个碱性氨基酸残基(2 个赖氨酸,1 个精氨酸),不含酸性氨基酸残基,因此分子带较多正电荷,属于碱性较强的分子。另外,带有的疏水性氨基酸比例较高,达到

60%。PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub> 的结构预测图见图 1。

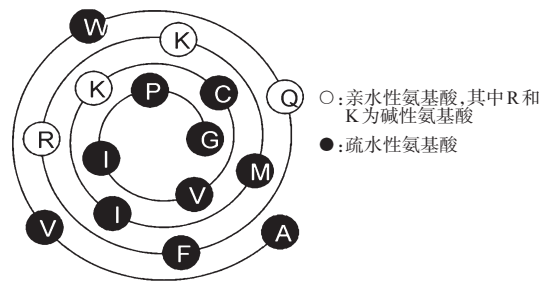


图 1 PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub> 的结构预测图

Fig 1 Structure prediction of PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub>

由图 1 可知,此分子的 3 个碱性氨基酸都列于螺旋结构的一侧,整个分子的疏水面与亲水面分列在两个面上,这是抗菌肽螺旋分子常具有的典型结构。

### 3.2 PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub> 对 G<sup>+</sup> 菌的杀菌活性

PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub> 对 G<sup>+</sup> 菌的杀菌活性见表 1。

表 1 PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub> 对 G<sup>+</sup> 菌的杀菌活性( $\bar{x} \pm s, \%, n=5$ )

Tab 1 Bactericidal activity of PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub> against Gram-positive bacteria ( $\bar{x} \pm s, \%, n=5$ )

菌种	多肽作用质量浓度, μg/ml			
	15.625	62.5	250	1 000
金黄色葡萄球菌	10 ± 17.32	36.55 ± 17.32	83.52 ± 9.00	96.23 ± 3.05
枯草芽孢杆菌**	19.11 ± 28.69	89.73 ± 3.75	100 ± 0	100 ± 0
粪肠球菌**	14.28 ± 15.26	60.22 ± 6.74	95.49 ± 1.83	100 ± 0

与金黄色葡萄球菌比较: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与枯草芽孢杆菌比较: \* $P < 0.05$

vs. *Staphylococcus aureus*: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; vs. *Bacillus subtilis*: \* $P < 0.05$

由表 1 可知, PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub> 质量浓度为 1 000 μg/ml 时对 3 种 G<sup>+</sup> 菌的杀菌率几乎都达到 100%; 250 μg/ml 时杀菌率也达到 80%~100%。杀菌敏感性由高到低依次为: 枯草芽孢杆菌 > 粪肠球菌 > 金黄色葡萄球菌。统计分析显示,  $F = 7.845, P = 0.00$ , 表明 PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub> 对 3 种 G<sup>+</sup> 菌杀菌率的差异具有统计学意义; 经两两比较 PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub> 对 3 种 G<sup>+</sup> 菌的杀菌活性均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

### 3.3 PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub> 对 G<sup>-</sup> 菌的杀菌活性

PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub> 对 G<sup>-</sup> 菌的杀菌活性见表 2。

表 2 PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub> 对 G<sup>-</sup> 菌的杀菌活性( $\bar{x} \pm s, \%, n=5$ )

Tab 2 Bactericidal activity of PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub> against Gram-negative bacteria ( $\bar{x} \pm s, \%, n=5$ )

菌种	多肽作用质量浓度, μg/ml			
	15.625	62.5	250	1 000
大肠埃希菌	22.63 ± 18.17	40.30 ± 21.48	58.24 ± 18.04	93.21 ± 4.31
变形杆菌*	8.86 ± 9.60	21.61 ± 9.04	40.92 ± 8.32	87.57 ± 4.77
铜绿假单胞菌**	19.71 ± 12.80	40.55 ± 10.95	83.71 ± 17.76	93.51 ± 8.18

与大肠埃希菌比较: \* $P < 0.05$ ; 与变形杆菌比较: \*\* $P < 0.01$

vs. *Escherichia coli*: \* $P < 0.05$ ; vs. *Proteus bacillus vulgaris*: \*\* $P < 0.01$

由表 2 可知, PLA<sub>2</sub>N<sub>1-15</sub> 质量浓度为 1 000 μg/ml 时对 3 种 G<sup>-</sup> 菌的杀菌率为 87%~93%; 250 μg/ml 时仍有一定的杀菌活性,

杀菌率为40%~83%。杀菌敏感性由高到低依次为铜绿假单胞菌>大肠埃希菌>变形杆菌。统计分析显示, $F=10.316$ , $P=0.00$ ,表明 $PLA_2N_{1-15}$ 对3种G<sup>-</sup>菌的杀菌率的差异具有统计学意义;经两两比较 $PLA_2N_{1-15}$ 对大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的杀菌活性差异无统计学意义,对大肠埃希菌和变形杆菌、变形杆菌和铜绿假单胞菌的杀菌活性差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。

## 4 讨论

### 4.1 $PLA_2N_{1-15}$ 的设计和合成

由于新的耐药菌株不断被发现和扩散,细菌耐药问题已经成为世界性的难题,因此,不断开发新的抗菌药物很有必要。抗菌肽与传统的抗生素有着完全不同的抗菌机制,因此成为解决细菌耐药问题的热点目标。本课题组曾对II A型 $PLA_2$ 进行了杀菌活性研究,发现其具有很强的杀菌活性<sup>[5]</sup>,并且根据其N、C端结构合成的多肽也具有杀菌活性<sup>[6-7]</sup>。虽然人I型 $PLA_2$ 不具有杀菌活性,但其N末端结构与II A型 $PLA_2$ 相似,都是只含有碱性氨基酸而无酸性氨基酸,带净正电荷,这也是多数抗菌肽具有的结构特点。笔者根据人I型 $PLA_2$ 的N末端的15个氨基酸残基为模板,合成小分子多肽 $PLA_2N_{1-15}$ ,杀菌活性研究结果表明,其具有较强的杀菌活性。

### 4.2 $PLA_2N_{1-15}$ 的杀菌活性与分子结构的关系

本研究选择了一些有代表性的G<sup>+</sup>菌和G<sup>-</sup>菌作为研究对象,杀菌试验结果表明, $PLA_2N_{1-15}$ 对试验的G<sup>+</sup>菌和G<sup>-</sup>菌均有较强的杀菌活性,特别是对G<sup>+</sup>菌。尽管I型 $PLA_2$ 不具有杀菌活性,但根据其N末端合成的多肽分子却具有较强的杀菌活性,这应该是由他们分子结构的特点所决定的。笔者前期研究发现,具有杀菌活性的 $PLA_2$ 都含有较多的碱性氨基酸,带有较多的净正电荷。杀菌活性的强弱与 $PLA_2$ 携带的正电荷呈正相关<sup>[8]</sup>。完整的人I型 $PLA_2$ 由125个氨基酸残基组成,其中含18个碱性氨基酸和13个酸性氨基酸,带5个净正电荷,等电点(PI)为8.0,呈弱碱性。而 $PLA_2N_{1-15}$ 由15个氨基酸残基组成,含3个碱性氨基酸,不含酸性氨基酸,带3个净正电荷,PI为10.1,分子呈很强的碱性。 $PLA_2N_{1-15}$ 的这一结构特点就是其具有杀菌活性的基础。而目前已知的抗菌肽,绝大多数都是带净正电荷的碱性肽。另外,已知的抗菌肽中,有一类分子具有螺旋结构,而I型 $PLA_2$ 的N末端(1~12位)正是螺旋结构,因此也可能是 $PLA_2N_{1-15}$ 具有杀菌活性的重要因素。

### 4.3 $PLA_2N_{1-15}$ 的杀菌机制

抗菌肽的杀菌机制有多种,多数学者认为是通过损伤细菌胞膜的机制发挥作用<sup>[9]</sup>。细菌细胞膜的内外层都含有大量的酸性磷脂,使细菌的细胞膜带有大量的负电荷。带正电荷的抗菌肽首先通过静电作用分别与G<sup>+</sup>菌细胞壁的磷壁酸和

G<sup>-</sup>菌细胞壁脂多糖的阴离子磷酸作用,使其吸附到细菌表面,进而穿过细胞壁与细胞膜结合使细菌胞膜受损、破裂从而导致细菌死亡。高等生物是由真核细胞组成,而真核细胞的细胞膜外层主要由不带电荷的中性磷脂组成,因此抗菌肽不能结合到真核细胞膜上,所以理论上对人等高等生物没有危害<sup>[10]</sup>。

## 参考文献

- [1] Guani-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, et al. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease[J]. *Clin Immunol*, 2010, 135(1):1.
- [2] Velden WJ, van Iersel TM, Blijlevens NM, et al. Safety and tolerability of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 (hLF1-11)[J]. *BMC Med*, 2009, doi: 10.1186/1741-7015-7-44.
- [3] Dennis EA. Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A2[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(18): 13 057.
- [4] Weinrauch Y, Abad C, Liang NS, et al. Mobilization of potent plasma bactericidal activity during systemic bacterial challenge. Role of group II A phospholipase A2[J]. *J Clin Invest*, 1998, 102(3):633.
- [5] 李艳,梁宁生,杨帆,等.重组人血小板磷脂酶A<sub>2</sub>体外抗金黄色葡萄球菌的活性及其影响因素研究[J]. *中国药房*, 2008, 19(2):2 177.
- [6] 安娜,梁宁生.衍生自人II A型磷脂酶A<sub>2</sub>N-端的多肽h $PLA_2N_{1-11}$ 杀菌活性的研究[J]. *广西医学*, 2012, 34(6):689.
- [7] 何睿林,梁宁生.人II A型磷脂酶A<sub>2</sub>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.
- [8] 梁宁生,杨帆,陆益,等.具强杀菌活性的兔II型磷脂酶A<sub>2</sub>互补DNA克隆及其顺序确定的研究[J]. *广西医科大学学报*, 1999, 16(3):237.
- [9] Guilhelmelli F, Vilela N, Albuquerque P, et al. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance[J]. *Front Microbiol*, 2013, doi: 10.3389/fmicb.2013.00353.
- [10] Wiesner J, Vilcinskas A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system[J]. *Virulence*, 2010, 1(5):440.

(收稿日期:2014-01-22 修回日期:2014-04-11)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊, 欢迎投稿、订阅