

海洋活性物质 C03 抑菌及抗流感病毒的作用^{*}

梅雪婷, 许东晖, 许实波

(中山大学药学院中药与海洋药物研究室, 广东 广州 510275)

摘 要: 活性物质 C03 是从海洋分离出一种相对分子质量小于 5 000 的抑菌肽, 该物质对金黄色葡萄球菌 (26001) 等多种传染细菌及流感病毒鼠肺适应株 FM₁, 表现出具有较好的抑菌及抗病毒作用, 可望开发一种抗菌及抗病毒海洋新药。

关键词: 抑菌肽; 抗菌; 抗流感病毒

中图分类号: R512.6 **文献标识码:** AA **文章编号:** 0529-6579 (2003) 05-0067-03

从海洋生物中寻找新型抗菌及抗病毒海洋活性物质是当今新药研究及开发的重点。抗菌肽在海洋脊椎动物的粘液及骨髓细胞中广泛存在, 这些肽类物质具有广谱活性, 能对抗病原细菌、真菌、寄生虫及有包膜病毒。如从冬比目鱼 *Pleuronectes americanus* 皮肤粘性分泌物中, 发现一种新型的 25-氨基酸线性抗菌肽。此抗菌肽通过多步层析法纯化后, 高效液相层析得到一个单峰, 定名为 Pleurocidin。经细菌细胞溶解平板检测法, 检测具有对抗大肠杆菌 *Escherichia coli* 的抗菌活性。Pleurocidin 与以下两种抗菌肽具高度同源性: 来自地中海蝇的 ceratotoxin 和来自树蛙皮肤的 dermaseptin。测定其对抗革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌的最小抑菌浓度 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MBC)。应用免疫组织化学, 对 Pleurocidin 在比目鱼皮肤的表皮粘性细胞进行测试, 确定 Pleurocidin 代表了鱼类中发现的一种新型抗菌肽, 可能在先天宿主防御中起作用^[1]。本研究从海洋生物鲍鱼中分离出一种抗菌肽 C03, 研究其抑菌及抗流感病毒的作用。

1 材料和方法

1.1 材 料

抗菌肽 C03, 由广东中大亿达洲海洋生物科技公司提供; 使用时用生理盐水配成所需的浓度。

金黄色葡萄球菌 (26001), 甲型链球菌 (32213), 乙型链球菌 (32204), 卡他双球菌 (C5), 白喉杆菌 (38009), 肺炎双球菌 (31108), 绿脓杆菌 (100211), 大肠杆菌 (44102), 由中山大学基础医学部微生物教

研室提供; 病毒唑, 万古霉素, 由白云山制药股份有限公司生产。NIH 系小鼠, 由广东省医药实验动物中心提供, 合格证号: 26 2002A 001。流感病毒鼠肺适应株 FM₁, 由北京医学科学院医药生物技术研究提供。

1.2 方 法

1.2.1 最低抑菌浓度 (MIC) 测定 按文献 [2], 采用琼脂双倍稀释法测定 MIC, 分别做空白对照组、细菌对照组、抗菌肽 C03 实验组, 将抗菌肽 C03 按表 1 剂量均匀涂布在琼脂平板上, 然后将将受试菌液接种到琼脂平皿上, 接种菌量为 10^5 CFU/mL, 培养在 37 °C, $\varphi=5\%$ CO₂ 培养箱中, 24 h 后取出, 观察含不同浓度受试样品的平皿上细菌的生长情况, 以完全无菌生长的最低浓度为受试样品的 MIC。甲型、乙型链球菌、肺炎双球菌、白喉杆菌另接种在含 $w=10\%$ 兔血琼脂平皿上。

1.2.2 体内抗菌试验^[3] 分别取 NIH 系小鼠 100 只, 体质量为 18 ~ 22 g, 雌雄各半, 随机分 5 组, 每天腹腔给药一次, C03 剂量如表 2 所示, 每 20 g 体质量小鼠注射 0.4 mL, 连续给药 3 d 末次给药后 1 h, 将 5.5×10^7 CFU/mL 金黄色葡萄球菌液以每鼠 0.5 mL 剂量给予, 且另设模型组对照。感染后 24 h, 各组再连续给药 5 d, 继续观察 2 周, 记录动物的死亡数。

1.2.3 对小鼠流感病毒性肺炎的影响 将体重为 18 ~ 22 g 的 NIH 小鼠随机分组, 受试组于感染前 1 d 开始滴鼻给药, 50 μ L 每次, 每天 2 次, 连续 5 d, 空白对照组给予同容积蒸馏水滴鼻。各组在乙醚轻度麻醉下感染流感病毒鼠肺适应株 FM₁ 15 LD₅₀, 感

* 收稿日期: 2002-12-02

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (001285)

作者简介: 梅雪婷 (1975 年生), 女, 助教; 通讯联系人: 许东晖, E-mail: lscdb@zsu.edu.cn

染后 96 h 处死, 称体质量后取肺称量, 计算出肺和肺指数抑制率

指数值 (每 100 g 体质量的肺质量)

$$\text{肺指数值} = \frac{\text{肺质量}}{\text{体质量}} \times 100\%$$

$$\frac{\text{空白对照组平均肺指数} - \text{给药组平均肺指数}}{\text{空白对照组平均肺指数}} \times 100\%$$

并进行组间 t 检验。

表 1 抑菌肽 C03 的体外抑菌作用
Tab 1 Bacteriostatis of C03 *in vitro*

分组	稀释度	药物浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	甲链球菌	肺炎球菌	乙链球菌	疾病杆菌	金葡球菌	绿脓球菌	大肠杆菌	卡他球菌
C03 组	1: 5	100	—	—	—	—	—	—	—	—
	1:10	50	—	—	—	—	—	—	—	+
	1:20	25	—	—	—	—	+	+	—	+
	1:40	12	+	—	—	—	+	+	+	+
	1:80	6.3	+	+	+	+	+	+	+	+
空白对照	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
细菌对照	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+

1) + 表示有细菌生长, — 表示无细菌生长

表 2 抑菌肽 C03 对感染细菌小鼠的保护作用
Tab 2 The protective effects of C03 on mouse which infected bacteria

组别	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	动物数 只	大肠杆菌		痢疾杆菌		肺炎球菌		乙型链球菌	
			存活数/只	存活率/%	存活数/只	存活率/%	存活数/只	存活率/%	存活数/只	存活率/%
空白对照	—	20	2	10	2	10	1	5	1	5
C03 组	6.25	20	6 ¹⁾	30	7 ¹⁾	35	8 ¹⁾	30	8 ¹⁾	40
	12.5	20	9 ¹⁾	45	10 ¹⁾	50	11 ²⁾	55	12 ²⁾	60
	25.0	20	12 ¹⁾	60	13 ¹⁾	65	14 ²⁾	70	13 ²⁾	65
阳性组	36	20	12 ¹⁾	60	12 ¹⁾	60	12 ²⁾	60	12 ²⁾	60

与空白对照组相比, 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$, χ^2 试验

1.2.4 对因小鼠体内感染流感病毒所致死亡的保护作用 将小鼠随机分为病毒对照组及给药组, 分别以 FM_1 2 LD_{50} 滴鼻感染, 给药组自感染病毒前 1 d 开始到感染后 4 d, 共滴鼻给药, 每次 0.05 mL, 每天 2 次, 病毒对照组滴鼻给予等量蒸馏水, 逐日观察动物发病和死亡数, 并观察 14 d, 计算死亡保护率及生命延长率。

2 结果与讨论

抗菌肽是节肢动物、两栖动物和哺乳动物等许多动物抵抗微生物侵染的主要机制之一, 抗菌肽能杀死大多数细菌 (包括 G^+ 和 G^- 细菌)。已知海洋抗菌肽具有许多的药效作用: ①促进伤口愈合; 抗菌肽是先天免疫力最早形成的分子效应器之一, 并且在众多物种的宿主防御应答的第一线起重要作用; ②皮肤、气管、胃肠道的防卫素; 在许多物种的发炎细胞中, 发现大量的抗菌肽, 但近来目标转移到黏性表皮上来。许多物种的黏性表皮层作用, 是对付严酷的外部环境的生理屏障; ③抗细菌、真菌、浮游生物的作用; 现已由许多水生品种中分离得到与上述 demaseptin 和 ceratoxin 结构不同的天然

抗生素。例如 squalamine 是从角鲨目鲨鱼 (dogfish shark) 中分离的阳离子甾体抗生素, 实验证明其具广谱抗微生物作用, 可对抗革兰氏阴性细菌、革兰氏阳性细菌、真菌以及浮游生物。因此, 许多海洋生物具有一个粘性屏障, 抵挡外界的许多微生物环境, 因此存在一个先天宿主防御机制抵抗感染 (表 3, 4)。

冬比目鱼 *Pleuronectes americanus* 的表皮分泌液, 已确定存在抗菌肽。从冬比目鱼的表皮粘性细胞, 可产生一种新型的 25 氨基抗菌肽 Pleurocidin, 并进行分析和鉴别。冬比目鱼皮肤分泌物进行 SDS-PAGE 分析, 在 < 5000 肽区段。这些组分富集并经离子交换 HPLC, 25.7 min 时洗脱的单峰具抗微生物活性。经反相 HPLC 进一步纯化后, 得到 29.1 min 洗脱的单峰具抗微生物活性。此种肽保留时间类似 magainin 和 defensin。该组分在煮沸 5 min 后仍保留有活性。然而, 经 $20 \mu\text{g/mL}$ 蛋白酶 K 37°C 处理 30 min, 显示蛋白溶解性消化后, 所有抗微生物活性皆消失。

本研究从海洋生物鲍鱼中分离出一种相对分子质量 5 000 抑菌肽, 它对金黄色葡萄球菌 (26001)、

甲型链球菌(32213)、乙型链球菌(32204)、卡他双球菌(C_5)、白喉杆菌(38009)、肺炎双球菌(31108)、绿脓杆菌(100211)、大肠杆菌(44102)及流感病毒鼠肺适应株 FM₁, 表现出具有较好的抑菌及抗病毒作用。C03 抗菌肽发挥作用是通过结合细菌细胞膜或病毒表面, 并引起细胞、病毒内容物的溶解, 不易引起耐药性。《自然—医学》杂志上发表的一份报告表

明, 美国的肺炎链球菌 *Streptococcus pneumoniae* 耐药菌株正在增加。*S. pneumoniae* 每年能够导致数千例脑膜炎、鼻窦炎、耳部感染和肺炎^[4]。在全球各医院都相继出现耐药性超级病株, 所以, 从海洋生物中寻找新型的抗菌及抗病毒药物是抵抗耐药性细菌及病毒的有效途径。本研究将进一步研究该蛋白的氨基酸序列, 进行基因克隆。

表 3 抑菌肽 C03 对小鼠感染病毒性肺炎的作用 ($\bar{x} \pm SD$, $n=10$)
Tab 3 Effects of C03 on mouse which infected influenza virus FM₁

组别	N/只	给药质量浓度/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	K(肺指数)	抑制率/%
病毒对照	10	—	1.58±0.21	—
正常对照	10	—	1.02±0.21 ²⁾	—
病毒唑	10	1000	1.29±0.26 ¹⁾	18.4
抑菌肽 C03	10	25	1.35±0.23 ²⁾	14.6
	10	50	1.21±0.19 ²⁾	23.4
	10	100	1.16±0.19 ²⁾	26.6

与病毒对照组相比, 1) $P<0.05$, 2) $P<0.001$

表 4 抑菌肽 C03 对小鼠感染病毒性肺炎所致死亡的保护作用($\bar{x} \pm SD$, $n=10$)
Tab 4 Effects of C03 on the death rate of mouse which infected influenza virus FM₁

组别	N/只	给药质量浓度/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	死亡/只	死亡率/%	平均存活时间/d
病毒对照	10	—	8	80	9.9±2.5
正常对照	10	—	0	0	14.0±0.0 ³⁾
病毒唑	10	1000	5	50	11.6±2.6 ¹⁾
抑菌肽 C03	10	25	6		12.2±1.9 ²⁾
	10	50	3	60	13.5±0.9 ³⁾
	10	100	2	30	13.6±0.8 ³⁾

与病毒对照组相比, 1) $P>0.05$, 2) $P<0.05$, 3) $P<0.001$

参考文献:

[1] ALEXANDER M C, PEEDRICK W, GILL D. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder[J]. J BIOL CHEM, 1997, 272(18): 12008—12013.

[2] KANG K H, JANG S K, KIM B K, et al. Antibacterial phenylpropanoid glycosides from *Paulownia tomentosa* Steud [J]. Arch Pharm Res, 1998, 17(6): 470—475.

[3] SAMAKOVLIS C, KYLSTEN P, KIMBRELL D A, et al. The andropin gene and its product, a male-specific antibacterial peptide in *Drosophila melanogaster*[J]. EMBO J, 1991, 10: 163—169.

[4] McCORMICK A W, WHITNEY C G, FARLEY M M, et al. Geographic diversity and temporal trends of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae* in the United States [J]. Nature Medicine, 2003, 9: 424—430.

The Bacteriostatic and Anti influenza Virus Effects of Marine Active Material C03

MEI Xue ting, XU Dong hui, XU Shi bo
(Laboratory of Chinese Herb and Marine Drugs //School of Pharmaceutical Sciences,
SUN Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: An new marine active material C03 was separated. It was one kind of bacterstatic peptide with a relative molecular mass less than 5 000. It had inhibiting effects for infectious bacteria such as *Staphylococcus aureus* (26001), and influenza virus FM1, could be developed into new marine drug.

Key words: bacteriostat peptide; bacteriostat; anti influenza virus