

## 鱼类表皮黏液抗菌蛋白 肽研究进展

梁 英<sup>1, 2, 3, 4</sup> 黄文树<sup>2, 4</sup> 关瑞章<sup>1, 2, 4</sup> 徐同玲<sup>2</sup>

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 集美大学水产学院, 厦门 361021;  
3. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 4. 集美大学水产生物技术研究所, 厦门 361021)

### THE REVIEW OF THE STUDIES ON THE ANTIBACTERIAL PROTEINS/PEPTIDES FROM FISH MUCUS

LIANG Ying<sup>1, 2, 3, 4</sup>, HUANG Wen-Shu<sup>2, 4</sup>, GUAN Rui-Zhang<sup>1, 2, 4</sup> and XU Tong-Ling<sup>2</sup>

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Aquaculture College of Jimei University, Xiamen 361021, China; 3. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;  
4. Institute of Aquaculture Biotechnology, Jimei University, Xiamen 361021, China)

关键词: 鱼类表皮黏液抗菌蛋白 肽; 种类; 抗菌活性

Key words: Antibacterial protein/peptide; Fish mucus; Kind; Antibacterial activity

中图分类号: Q175 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2009)05-0963-07

鱼类的皮肤与水环境直接接触, 皮肤上覆盖着一层由上皮细胞和表皮杯状细胞分泌的黏液, 其具有许多重要的生理作用: 如作为渗透压调节器、天然润滑剂和鱼类种内化学信息传递介质。此外, 鱼类表皮黏液还具有免疫学功能<sup>[1, 2]</sup>。黏液中存在如补体、溶菌酶、凝集素、抗蛋白酶 (如  $\alpha$  巨球蛋白)、转移因子、C 反应性蛋白、几丁质酶和干扰素等先天性防御因子。这些物质可以中和细菌 (如  $\alpha$  巨球蛋白), 抑制细菌 (如转移因子) 或作为调理素增加吞噬细胞的吞噬量 (如 C 反应性蛋白、补体), 直接分解细菌 (如溶菌酶、补体) 或真菌 (如几丁质酶), 或抑制病毒复制 (如干扰素)<sup>[3]</sup>。近十多年来, 对补体、干扰素等对细菌起间接抑制作用以及凝集素、溶菌酶等对细菌起直接抑制作用的鱼类黏液中非特异性免疫因子的成分、分子结构、功能等方面的研究已经取得了一定的进展<sup>[2-5]</sup>, 而对鱼类黏液中对细菌起直接抑制作用的另一类重要物质——抗菌蛋白或肽的研究还比较少。本文就鱼类表皮黏液中的抗菌蛋白 肽的种类、结构、活性等研究进行综述, 探讨其在免疫防御中的作用及应用前景。

### 1 鱼类表皮黏液抗菌蛋白 肽研究进展

根据分子量 ( $M_r$ ) 大小, 将鱼类表皮黏液中分离得到的抗菌蛋白 肽大致分为: 抗菌蛋白 ( $M_r > 10$  kD) 和抗菌肽 ( $M_r \leq 10$  kD) 两大类, 它们的抗菌作用机制相近, 即采用膜攻击作用在脂质双分子层上产生穿孔现象, 破坏细胞的完整性, 造成细胞内容物外溢而死亡。

#### 1.1 抗菌蛋白

已从斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)<sup>[6]</sup>、虹鳟鱼 (*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[7, 8]</sup>、大西洋鲑鱼 (*Gadus morhua*)<sup>[9]</sup>、鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)<sup>[11]</sup>、丁鲷 (*Tinca tinca*)<sup>[8]</sup>、许氏平鲈 (*Sebastes schlegelii*)<sup>[10, 11]</sup>、日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*)<sup>[12, 13]</sup>、红鳍东方鲀 (*Fugu rubripes*)<sup>[14]</sup>、欧洲鳗鲡 (*Anguilla anguilla*)<sup>[8, 15]</sup>、王后鹦嘴鱼 (*Scarus vetula*)<sup>[16]</sup>、星康吉鳗 (*Conger myriaster*)<sup>[17]</sup>、褐篮子鱼 (*Siganus fuscescens*)<sup>[18]</sup>、Tambacu (双齿巨脂鲤和大盖巨脂鲤的杂交品种)<sup>[19]</sup>、泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*)<sup>[20]</sup> 等鱼类的表皮黏液中分离到十几种抗菌蛋白, 根据其性质主要分为组蛋白样抗菌蛋白和糖蛋白样抗菌蛋白两类。

收稿日期: 2008-09-26; 修订日期: 2009-05-01

基金项目: 农业部公益性行业 (农业) 科研专项经费 (nyhyzx07-043); 福建省科技厅高校专项 (2007F5079); 集美大学博士启动金项目 (ZQ2006024) 资助

作者简介: 梁英 (1979—), 女, 汉族, 福建莆田人; 博士研究生, 助理研究员; 主要从事渔业水体生态与病害防治研究。E-mail: liangyingnan-ping@yahoo.com.cn

通讯作者: 关瑞章, 教授; E-mail: rzguan@jmu.edu.cn

表 1 糖蛋白样抗菌蛋白主要性质

Tab. 1 The main characteristics of glycoprotein-like antibacterial proteins

| 来源 成分<br>Origin Compound                                                            | 分子量<br>Mr(kD) | 理化性质<br>Physical and Chemical Properties                                                                                                                                                                               | 结构<br>Structure                                          | 参考文献<br>References |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|--------------------|
| 鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>                                                           | 27            | 结合甘露糖                                                                                                                                                                                                                  |                                                          | [1]                |
| 丁鲷 <i>Tinca tinca</i>                                                               | 49            | 1. 包含唾液酸成分<br>2. 结合甘露糖                                                                                                                                                                                                 | 具有 $\alpha$ 螺旋和无规则卷曲结构                                   | [8]                |
| 虹鳟鱼 <i>Oncorhynchus mykiss</i>                                                      | 65            | 包含唾液酸成分                                                                                                                                                                                                                | 具有 38% $\alpha$ 螺旋、16% $\beta$ 折叠和<br>46%无规则卷曲结构         | [8]                |
| 许氏平鲈 <i>Sebastes schlegeli</i> SSAP<br>( <i>S. schlegeli</i> antibacterial protein) | 120           | 1. 含有 D甘露糖和 N乙酰葡萄糖胺<br>2. 属于 L氨基酸氧化酶家族,抑菌作用会因为加入过氧化氢酶而减弱                                                                                                                                                               | 1. 具有二聚体结构<br>2. 含有 28.2% $\alpha$ 螺旋结构                  | [10, 11]           |
| 日本鳎 <i>Anguilla japonica</i><br>AJL-1                                               | 16            | 1. 凝集兔红细胞<br>2. pH 3—12其凝集活性基本稳定, pH2 和 13时,凝集活性完全丧失<br>3. 加入 EDTA、EGTA、CaCl <sub>2</sub> 、MgCl <sub>2</sub> 、MnCl <sub>2</sub> 或者 1 mol/L NaCl不影响其凝集活性<br>4. 黏附难辨链球菌 ( <i>Streptococcus difficile</i> )<br>5. 专一性结合乳糖 | 1. 具有二聚体结构<br>2. N末端封闭<br>3. 不含半胱氨酸残基<br>4. 与半乳凝素家族同源性较高 | [12]               |
| 日本鳎 <i>Anguilla japonica</i><br>AJL-2                                               | 31            | 1. 凝集兔红细胞<br>2. 热稳定性好, 80℃加热 5min,凝集活性完全丧失<br>3. pH 3—12其凝集活性基本稳定, pH2 和 13时,凝集活性完全丧失<br>4. 加入 EDTA 或者 1 M NaCl,不影响其凝集活性<br>5. 抑制大肠杆菌的生长并能黏附福尔马林灭活的大肠杆菌<br>6. 专一性结合乳糖                                                  | 氨基酸序列与 C-type 凝集素有<br>30%—35%的同源性                        | [13]               |
| 红鳍东方鲀 <i>Fugu rubripes</i><br>pufflectin-s                                          | 26            | 1. 凝集兔红细胞<br>2. 加入 EDTA 和 CaCl <sub>2</sub> ,凝集活性不会改变<br>3. 对分离至红鳍东方鲀的 5种革兰氏阴性菌有凝集作用,对分离至水体中的 6种革兰氏阴性菌也有凝集作用<br>4. 能够凝集冈本异沟吸虫 ( <i>Heterobothrium Okamotoi</i> )<br>5. 专一性结合 D甘露糖<br>6. 等电点 (pI)为 6.42                 | 1. 具有二聚体结构<br>2. N末端封闭<br>3. 与单叶甘露糖凝集素具有高度同源性            | [14]               |

组蛋白样抗菌蛋白 组蛋白是存在于染色体内与 DNA 结合的碱性蛋白质,近十年才有关于组蛋白或者来源于组蛋白 (主要是 H2A 和 H2B) 的片段具有杀菌作用的研究报道<sup>[7]</sup>。水生动物中的组蛋白样抗菌蛋白 (Histone-like proteins, HLPs) 多在鱼类中发现,如: 1998 年, Robinette, et al. 从斑点叉尾鲷中分离到的分子量为 15.5 kD 的蛋白,其氨基酸序列类似组蛋白 H2B,对嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的最小抑菌浓度 (MIC) 值分别为 50—100  $\mu\text{g/mL}$  和  $(0.37 \pm 0.023) \mu\text{m/L}$ <sup>[6]</sup>; 2002 年, Fernandes, et al. 从虹鳟鱼中分离到的 13.6 kD 的蛋白,类似

组蛋白 H2A,该蛋白对革兰氏阳性菌具有较好的抑菌效果, MIC 在微摩尔级,比 Boman, et al. 从美国天蚕 (*Hyatophora cecropia*) 蛹中分离到的抗菌活性多肽 -cecropin 低约 10 倍,其对革兰氏阴性菌和真菌也有抑菌作用,该蛋白还能够杀死引起鲑鱼肾脏疾病的主要病原菌 鲑鱼肾杆菌 (*Renibacterium salmoninarum*)<sup>[7]</sup>; 2005 年, Bergsson, et al. 从大西洋鲑鱼的皮肤黏液中分离到的 13.565 kD 的抗菌蛋白类似组蛋白 H2B,对巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、大肠杆菌 (*E. coli*) 和白色念珠菌 (*Candida albicans*) 都有抑菌活性<sup>[9]</sup>。后两种抗菌蛋白都对盐敏感,并且在低浓度时没有溶血活性。

表 2 抗菌肽主要性质

Tab. 2 The main characteristics of antibacterial peptides

| 来源 成分<br>Origin Compound                                                                             | 分子量<br>Mr                                                                                                                                                                        | 理化性质<br>Physical and Chemical Properties                                                                                                                                                                                                                                            | 结构<br>Structure                                                                             | 参考文献<br>References |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| 泥鳅 <i>Misgurnus anguillicaudatus</i> MAAP ( <i>Misgurnus anguillicaudatus</i> antimicrobial protein) | Mr: 9800 D<br>氨基酸残基数: 94                                                                                                                                                         | 1. 富含 Cys<br>2. 耐热, 60°C加热 30min, 能保持 70%以上抗菌活性<br>3. pI为 4.78                                                                                                                                                                                                                      | 1. 具有 $\alpha$ 螺旋结构<br>2. N末端氨基酸序列为 CFGWN                                                   | [22]               |
| 豹鲂 <i>Pardachinus pavoninus</i> Pardaxins P-2                                                        | Mr: 3212 D<br>氨基酸残基数: 33<br>(GFFALIPKIISSPLFKTLLSAVGSALSSSGEQE)                                                                                                                  | 1. 强表面活性剂, 物理和药理性质类似于蜂毒素<br>2. 高浓度时导致胞溶作用<br>3. pI为 6.39*, 两性性*                                                                                                                                                                                                                     | 1. 具有 $\alpha$ 螺旋结构<br>2. 末端有一个明显的亲水羧基                                                      | [24]               |
| 美洲黄盖鲷 <i>Pleuronectes americanus</i> Pleurocidin                                                     | Mr: 2711 D<br>氨基酸残基数: 25<br>(GWSFFKKAHVGHVGHKAALTHYL)                                                                                                                            | 1. 100°C加热 5min, 抗菌活性不改变<br>2. 37°C时和蛋白酶 K孵育 30min, 抗菌活性消失<br>3. pI为 10.20*, 两性性*<br>pI为 10.40*, 两性性*                                                                                                                                                                               | 具有 $\alpha$ 螺旋结构                                                                            | [25]               |
| 大西洋鲑鱼 <i>Salmo salar</i> SAMP H1 (salmon antimicrobial peptide H1)                                   | Mr: 2836 D<br>氨基酸残基数: 30<br>(AEVAPAPAAAAPAKAPKKK-AAA KPKKAGPS)                                                                                                                   | 1. 80°C加热 5min, 仍具抗菌活性<br>2. 浓度低于 1 $\mu$ mol/L 时对虹鳟鱼的红血球没有溶血作用<br>3. 对盐敏感<br>4. 理论 pI为 10.72                                                                                                                                                                                       | 1. 具有 $\alpha$ 螺旋结构*<br>2. N末端乙酰化<br>3. 是组蛋白 H1 N末端小肽片段<br>可能是来至 non-histone 染色体蛋白 H6 的一个片段 | [26]               |
| 虹鳟鱼 <i>Oncorhynchus mykiss</i> Oncorhyncin III                                                       | Mr: 6.7 kD<br>氨基酸残基数: 66                                                                                                                                                         | 1. 80°C加热 5min, 仍具抗菌活性<br>2. 浓度低于 1 $\mu$ mol/L 时对虹鳟鱼的红血球没有溶血作用<br>3. 对盐敏感<br>4. 理论 pI为 10.72                                                                                                                                                                                       | 1. 具有 $\alpha$ 螺旋结构<br>2. C末端酰胺化                                                            | [27]               |
| 杂交条纹鲈 <i>Morone saxatilis</i> moronecinin                                                            | Mr: 2543 D<br>氨基酸残数: 22<br>(FFHHIFRGMHVGTTH (K/R) LVTGT)                                                                                                                         | 1. 富含 His<br>2. 存在两种异型体 (white bass moronecinin, striped bass moronecinin)<br>3. 高浓度阳离子存在下 synthetic white bass moronecinin 对 <i>S. aureus</i> 的 MIC 显著增加<br>4. Synthetic white bass moronecinin 浓度低于 2.5 $\mu$ mol/L 时对人 和 绵羊 红细胞没有溶血作用<br>5. pI为 12.11*, 两性性*<br>pI为 12.33*, 两性性* | 1. 具有 $\alpha$ 螺旋结构<br>2. C末端酰胺化<br>N末端乙酰化*                                                 | [29]               |
| 大西洋庸鲷 <i>Hippoglossus hippoglossus</i> hipposin                                                      | Mr: 5459 D<br>氨基酸残基数: 51<br>(SGRGKTGGKARAKAK-TRSSRAGLQFPVGRVHRL-LRKGN YAHRVGAPVYL)                                                                                               | 1. 浓度为 200 $\mu$ g/mL 时导致 0.2% 的人红血球溶血<br>2. pI为 12.41*, 两性性*                                                                                                                                                                                                                       | 1. 具有 $\alpha$ 螺旋和无规则卷曲结构<br>2. 氨基酸序列与组蛋白 H2A 的 N 端完全一致<br>具有 $\alpha$ 螺旋结构                 | [30]               |
| 鳕鱼 <i>Parasilurus asotus</i> Parasin I                                                               | Mr: 2000.4 D<br>氨基酸残基数: 19<br>(KGRGKQGGKVRAKATRSS)                                                                                                                               | 1. 浓度为 200 $\mu$ g/mL 时导致 0.2% 的人红血球溶血<br>2. pI为 12.41*, 两性性*                                                                                                                                                                                                                       | 1. 具有 $\alpha$ 螺旋和无规则卷曲结构<br>2. 氨基酸序列与组蛋白 H2A 的 N 端完全一致<br>具有 $\alpha$ 螺旋结构                 | [31, 32]           |
| 六线黑鲈 <i>Grammistes sexlineatus</i> grammistins Gs1, Gs2                                              | Gs1 氨基酸残基数: 25<br>(LFGHLIKLIPSLFGALSNIGRNRNQ)<br>Gs2 氨基酸残基数: 24<br>(LFGHLIPLPHIGAIPQVIGAIR)<br>Pp1 氨基酸残基数: 13<br>(FIGGIISFKRLF)<br>Pp3 氨基酸残基数: 25<br>(NWRKLLGQIASVGAGLLGSLLAGYE) | 对马红血球具有溶血活性                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                             | [33]               |
| 斑点须鲷 <i>Pogonoperca punctata</i> grammistins Pp1, Pp3                                                |                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                             |                    |

续表

| 来源 成分                                              | 分子量                                                  | 理化性质                                                                            | 结构                                      | 参考文献       |
|----------------------------------------------------|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------|
| Origin Compound                                    | Mr                                                   | Physical and Chemical Properties                                                | Structure                               | References |
| 泥鳅 <i>Misgurnus anguillicaudatus</i> misgurin      | Mr. 2502 D<br>氨基酸残基数: 21<br>(RQRVEELSKFSKKG AAARRRK) | 浓度在 10 μg/mL 以下对绵羊红细胞没有溶血活性                                                     | 具有 α 螺旋结构                               | [23]       |
| 石纹豹鲂 <i>Pardachinus marmoratus</i> Pardaxin I & II | Mr. 3529 D 和 3188 D<br>氨基酸残基数: 35 和 31               | 1. 富含 Asn, Ser, Gly, Ala, 缺乏 Arg, Tyr 和 Trp<br>2. 具有疏水性<br>3. 高浓度时能导致人红细胞的溶细胞作用 | N 末端氨基酸残基为 NH <sub>2</sub> -Gly-Phe-Phe | [34]       |
| 虹鳟鱼 <i>Oncorhynchus mykiss</i> oncorhynchin II     | Mr. 7.2 kD<br>氨基酸残基数: 69                             | 无明显的溶血作用                                                                        | 可能是组蛋白 H1 C 末端的一个片段                     | [28]       |

注: \* 表示 DNA Star 软件分析结果  
Note: \* Data were analyzed by DNA Star

**糖蛋白样抗菌蛋白** 糖蛋白是由短的寡糖链与蛋白质共价相连构成的分子,包括酶、激素、载体、凝集素、抗体等。糖蛋白的肽链与糖基以糖苷键共价连接,主要有两类:N型糖苷键为糖链与肽链上的 Asn 的酰氨基连接,N型糖苷键的寡糖链主要有 N-乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) 和甘露糖,还包括果糖、半乳糖、唾液酸;O型糖苷键是糖链与肽链上的 Ser、Thr 的自由羟基连接,一般不含甘露糖<sup>[21]</sup>。凝集素也是一类重要的糖蛋白,它能与糖结合,在细胞识别和黏附反应中起重要作用。凝集素还能和细菌的表面抗原发生反应并使之凝集,是机体免疫功能的重要成分之一。

从鱼类表皮黏液中分离的糖蛋白样抗菌蛋白,多为疏水性蛋白,分子量大多在 16—65 kD 之间,大部分具有 α 螺旋结构,含有唾液酸成分,可结合甘露糖,其中还有一些属于凝集素家族,能凝集兔红细胞,对某些致病菌也有凝集作用(表 1)。

1.2 抗菌肽

包括从泥鳅<sup>[22,23]</sup>、豹鲂 (*Pardachinus pavoninus*)<sup>[24]</sup>、美洲黄盖鲈 (*Pleuronectes americanus*)<sup>[25]</sup>、大西洋鲑鱼 (*Salmo salar*)<sup>[26]</sup>、虹鳟鱼<sup>[27,28]</sup>、杂交条纹鲈 (*Morone saxatilis*)<sup>[29]</sup>、大西洋庸鲈 (*Hippoglossus hippoglossus*)<sup>[30]</sup>、鲟鱼 (*Parasilurus asotus*)<sup>[31,32]</sup>、六线黑鲈 (*Grammistes sexlineatus*)<sup>[33]</sup>、斑点须鲈 (*Pogonoperca punctata*)<sup>[33]</sup>、石纹豹鲂 (*Pardachinus marmoratus*)<sup>[34,35]</sup> 等中分离到的十几种抗菌肽,具有以下性质:分子量在 2—10 kD;多为两亲性分子;具有 α 螺旋结构;大部分 pI 大于 10,属于阳离子肽。其中还有一些抗菌肽是来自组蛋白的一个小片段,如:从鲟鱼的皮肤黏液中分离到的 Parasin I,其氨基酸序列与组蛋白 H2A 的 N 端完全一致<sup>[31,32]</sup>;从大西洋鲑鱼中分离的 SAMP H1 是组蛋白 H1 N 末端的小肽片段<sup>[26]</sup> (表 2, 部分鱼类抗菌肽性质参考 <http://www.bbam.univ.trieste.it/~tossi/antimic.html>)。

1.3 鱼类表皮黏液抗菌蛋白 肽的抗菌谱和抗菌活性

涉及菌株有人和动植物常见菌:金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌 (*E. coli*)、枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*)、藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*)、巨大芽胞杆菌 (*B. megaterium*)、绿色气球菌 (*Aerococcus viridans*)、柠

檬色运动球菌 (*Planococcus citreus*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、醋酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*)、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*);水产养殖中常见鱼类致病菌:嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila*)、鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*)、鲑肾杆菌 (*R. salmoninarum*)、杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*)、副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)、腐败希瓦菌 (*Shewanella putrefaciens*)、鳃利斯顿氏菌 (*Listonella anguillanum*);真菌:白色念珠球菌 (*C. albicans*)、啤酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*)、光滑假丝酵母 (*Candida glabrata*)、葡萄假丝酵母 (*Candida lusitania*)、热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*)、新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*), MIC 多在 1—5 μg/mL (表 3)。

2 小结与展望

2.1 进一步分离纯化鱼类表皮黏液抗菌蛋白 肽

近年来,已经从十几种鱼类的表皮黏液中分离到几十种的抗菌蛋白和肽,但是还未见到鱼类表皮黏液抗菌蛋白 肽专利的报道,对鱼类表皮黏液抗菌蛋白 肽的进一步分离纯化并克隆基因,将弥补这方面的空白。目前,笔者采用酸抽提,结合使用离子交换层析和反相高效液相层析技术从日本鳊表皮黏液中分离到一个抗菌肽,对本实验室分离至发病鳊的常见致病菌 嗜水气单胞菌具有抑菌作用,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI TOF MS) 分析,结果显示其分子量为 6044.28 D。从分子量上看该抗菌肽不同于先前从欧洲鳊<sup>[8,15]</sup>和日本鳊<sup>[12,13]</sup>表皮黏液中分离的抗菌蛋白和凝集素。而且,根据离子交换层析结果推测其 pI 为 5 左右,也不同于从泥鳅<sup>[22]</sup>和豹鲂<sup>[24]</sup>表皮黏液中分离到的分子量分别为 9800 D 和 3212 D 的两种阴离子肽,因此,可能是一种新的阴离子肽。该抗菌肽的分离纯化为鱼类表皮黏液中阴离子肽的进一步分离纯化提供了基础数据。从文献资料上看对鱼类皮肤黏液抗菌蛋白 肽的研究主要集中在蛋白质的酶学活性、抗菌活性和氨基酸序列方面,基因克隆和表达方面的深入研究甚少,主要是从美洲黄盖鲈的表皮黏液中分离到的 pleurocidin<sup>[37]</sup>。对已知鱼类表皮黏液中分离得到的蛋白 肽的性质进行分析时发现,许多抗菌蛋白或

表 3 鱼类表皮黏液抗菌蛋白/肽对主要细菌的 MIC 值

Tab. 3 MIC of the antibacterial proteins/peptides from fish mucus for some main pathogenic bacteria

| 来源<br>Origin    | 革兰氏阳性菌 G <sup>+</sup> |             | 革兰氏阴性菌 G <sup>-</sup> |             |             |             | 参考文献       |
|-----------------|-----------------------|-------------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|------------|
|                 | 金黄色<br>葡萄球菌           | 枯草芽<br>孢杆菌  | 大肠<br>杆菌              | 嗜水气<br>单胞菌  | 杀鲑气<br>单胞菌  | 鳃弧菌         | References |
| 鲤鱼              | 5 μg/mL               |             | 5 μg/mL               | 5 μg/mL     |             |             | [1]        |
| 27 kD 蛋白        |                       |             |                       |             |             |             |            |
| 斑点叉尾鲷           |                       |             | (0.37 ±0.023)         | 50—         |             |             | [6]        |
| 15.5 kD 蛋白      |                       |             | μmol/L                | 10 μg/mL    |             |             |            |
| 虹鳟鱼             | >1.2 μmol/L           | 0.6 ±1.2    | >1.2 μmol/L           | >1.2 μmol/L | >1.2 μmol/L |             | [7]        |
| 13.6 kD 蛋白      |                       | μmol/L      |                       |             |             |             |            |
| 丁鲷              | 1 μg/mL               |             | 5 μg/mL               | 1 μg/mL     |             |             | [8]        |
| 49 kD 蛋白        |                       |             |                       |             |             |             |            |
| 欧洲鳗鲡            | 1 μg/mL               |             |                       | 1 μg/mL     |             |             | [8]        |
| 45 kD 蛋白        |                       |             |                       |             |             |             |            |
| 虹鳟鱼             | 1 μg/mL               |             | 1 μg/mL               | 1 μg/mL     |             |             | [8]        |
| 65 kD 蛋白        |                       |             |                       |             |             |             |            |
| SSAP            |                       | >5 μg/mL    | >5 μg/mL              | 0.3 μg/mL   | 0.07 μg/mL  |             | [10, 11]   |
| Pardaxin        |                       | 5 μmol/L    | 13 μmol/L             |             |             |             | [36]       |
| Pleurocidin     | 17.7—                 | 1.1—        | 2.2—                  |             | 17.7—       |             | [25]       |
|                 | 35 μmol/L             | 2.2 μmol/L  | 3.2 μmol/L            |             | 35 μmol/L   |             |            |
| Misgurin        | 8 μg/mL               | 8 μg/mL     | 8 μg/mL               |             |             |             | [23]       |
| Parasin I       | 2 μg/mL               | 1 μg/mL     | 1 μg/mL               |             |             |             | [31, 32]   |
| Gs1             | 6.25 μg/mL            | 25 μg/mL    | 50 μg/mL              |             | 50 μg/mL    | 50 μg/mL    | [33]       |
| Gs2             | 6.25 μg/mL            | 12.5 μg/mL  | 50 μg/mL              |             | 50 μg/mL    | 25 μg/mL    | [33]       |
| Pp1             | 3.13 μg/mL            | 3.13 μg/mL  | >50 μg/mL             |             | 50 μg/mL    | 12.5 μg/mL  | [33]       |
| Pp3             | 50 μg/mL              | 50 μg/mL    | >50 μg/mL             |             | 50 μg/mL    | 50 μg/mL    | [33]       |
| Synthetic       | 1.25—                 |             | 5—                    | >20 μmol/L  |             |             | [29]       |
| wbmoionecidin   | 2.5 μmol/L            |             | 10 μmol/L             |             |             |             |            |
| MAAP            | 0.3 μmol/L            | 0.15 μmol/L | 0.15 μmol/L           |             |             |             | [22]       |
| Oncorhyncin III |                       | 0.25—       | 0.25—                 | 0.25—       |             | >0.5 μmol/L | [27]       |
|                 |                       | 0.5 μmol/L  | 0.5 μmol/L            | 0.5 μmol/L  |             |             |            |
| Oncorhyncin II  |                       |             | 0.4—                  |             |             |             | [28]       |
|                 |                       |             | 0.8 μmol/L            |             |             |             |            |
| SAMP H1         |                       | 2 μmol/L    | 2 μmol/L              |             | 4 μmol/L    | 1 μmol/L    | [26]       |

肽 N 末端通常被修饰,如 N 端封闭<sup>[12,14]</sup>、N 末端乙酰化<sup>[26,30]</sup>、C 末端酰胺化<sup>[29]</sup>,由于这些抗菌蛋白或肽独特的 N 端及 C 端结构,给进一步开展鱼类表皮黏液中抗菌活性物质的基因克隆或表达造成了一定的困难。研究鱼类表皮黏液中分离到的 N 端或 C 端被修饰蛋白或肽的基因克隆机制可为研究其他生物甚至人类的同类蛋白或肽提供模板。

## 2.2 鱼类表皮黏液抗菌蛋白/肽的应用前景

鱼类表皮黏液抗菌蛋白/肽不仅抗菌谱广,抗菌活性强,而且从鱼类黏液中分离的一些特殊蛋白/糖蛋白除抗菌作用外还具有其他重要的生物功能,将这些抗菌肽的重要功能基因进行整合可以得到我们需要的重组肽,具有一定的生产

意义。

鱼类表皮黏液抗菌蛋白/肽有望替代抗生素 鱼类表皮黏液抗菌蛋白/肽活性强, MIC 大都小于 5 μg/mL,某些抗菌蛋白/肽的 MIC 小于 1 μg/mL,如:1996 年,从鲤鱼皮肤黏液中分离到的 27 kD 蛋白对藤黄微球菌的 MIC 为 0.5 μg/mL<sup>[1]</sup>;1998 年,从斑点叉尾鲷分离到的 15.5 kD 的蛋白对革兰氏阳性菌具有很好的抑菌效果, MIC 在微摩尔级,比 cecropin 低约 10 倍<sup>[6]</sup>。并且鱼类表皮黏液中分离的抗菌蛋白/肽对人类常见致病菌如:金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等和真菌如:白色念珠球菌<sup>[23,25,29,31,32]</sup>也有很好的抑菌效果,还具有无蓄积毒性、不易产生耐药性等特点,而当前人类真

菌病仍是一个难以解决的问题。因此,鱼类表皮黏液抗菌蛋白肽很有可能替代传统抗生素成为鱼类疾病防治的一种新型药物,并且也为治疗人类疾病提供新途径。

**糖蛋白特殊生物学功能的开发** 从鱼类表皮黏液中分离的抗菌蛋白中许多属于糖蛋白,虽然对这些糖蛋白的具体生物学功能还不太清楚,但是我们知道糖链具有许多重要的功能,如:作为识别和被识别反应过程中的信号标记;改善分子的疏水-亲水平衡点;更重要的是改善蛋白质的功能以及其他理化性能,如分子表面的电荷分布、酸碱性能、分子黏度和分子构型等,并且非糖基化的蛋白活性也大大低于糖蛋白<sup>[21]</sup>。此外,另一类糖蛋白凝集素,能够凝集大肠杆菌等多种革兰氏阴性菌,可能在抵御外源病原菌入侵方面起着重要作用<sup>[12-14]</sup>。并且这些凝集素还能专一性的结合某些糖基,如:从日本鳗鲡表皮黏液中分离的 AJL-1 和 AJL-2 能专一性结合乳糖<sup>[12,13]</sup>;从红鳍东方鲀分离的 pufferlectin-s 专一性结合 D 甘露糖<sup>[14]</sup>。凝集素最大的特点是能识别糖蛋白和糖脂细胞膜表面的糖基,作为研究细胞膜结构的探针<sup>[38]</sup>。因此,鱼类表皮黏液抗菌蛋白肽除了抗菌作用外,还具有其他生物学功能的开发潜力。

**重组肽的研究应用** 我们发现从鱼类表皮黏液中分离得到的许多抗菌肽具有溶血作用,如:从鲢鱼中分离到的 Parasin 能导致人红血球溶血<sup>[31,32]</sup>,从六线黑鲈和斑点须鲷中分离到的 graministins Gs1、Gs2、Pp1 和 Pp3 对马红细胞具有溶血活性<sup>[33]</sup>,以及从石纹豹鲷体中分离到抗菌肽 Pardaxin 具有较低的人红血球溶血活性<sup>[34,36]</sup>。Oren, *et al.* 在对 Pardaxin 及其类似物的研究中发现 Pardaxin 分子的第 7—11 位和 14—26 位氨基酸组成的片段皆为  $\alpha$  螺旋结构,12—13 位作为一个“铰合部”连接两个  $\alpha$  螺旋并形成“L”形的“螺旋转角螺旋”结构。Pardaxin 的这种结构在有选择性(有杀菌作用而无溶血作用)或无选择性(具有杀菌和溶血双重作用)的抗菌肽中都有发现,当去除 Pardaxin C 端 11 个氨基酸残基,通过破坏 Pardaxin 第二个  $\alpha$  螺旋结构,其溶血活性显著下降。这说明 Pardaxin 的  $\alpha$  螺旋结构有助于其溶血作用,但对抗菌活性并不是必需的。此外, Oren 还发现增加 Pardaxin N 端的正电荷可显著增强其抗菌活性,降低溶血作用<sup>[31,36]</sup>。因此,我们可以通过改造抗菌肽的结构,克服抗菌肽的毒副作用。另一方面,既然有些抗菌肽具有广谱的抗菌活性,有些抗菌肽具有溶解寄生虫的作用<sup>[19]</sup>,有些抗菌肽不具有溶血活性,我们可以将这些具有生产意义的基因进行整合得到我们需要的重组肽,使其能够应用到生产上。

已经有许多鱼类抗菌肽通过原核或真核表达系统被表达,并且随着对分离纯化、抗菌特性、表达调控及毒力性质等问题的进一步研究,鱼类抗菌肽将对人类及动物的健康产生深远的影响。

#### 参考文献:

[1] Lemaitre C, Orange N, Sagli P, *et al* Characterization and ion

channel activities of novel antibacterial proteins from the skin mucus of carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Eur J Biochem*, 1996, **240**: 143—149

[2] Ottesen O H, Olafsen J A. Ontogenetic development and composition of the mucous cells and the occurrence of saccular cells in the epidermis of Atlantic halibut [J]. *J Fish Biol*, 1997, **50**: 620—633

[3] Nie P. Recent advances of non-specific immunity in fish [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1997, **21**(1): 69—73 [聂品. 鱼类非特异性免疫研究的新进展. 水产学报, 1997, **21**(1): 69—73]

[4] Tang M, Ma G Z, Xu J. Advances in research of fish immunology [J]. *Immunological Journal*, 2002, **18**(3): 112—116 [唐玫, 马广智, 徐军. 鱼类免疫学研究进展. 免疫学杂志, 2002, **18**(3): 112—116]

[5] Chu W H. The foundation and applications of fish immunology [J]. *Reservoir Fisheries*, 1999, **19**(4): 4—6 [储卫华. 鱼类免疫学基础及其应用. 水利渔业, 1999, **19**(4): 4—6]

[6] Robinette D, Wada S, Arnoll T, *et al* Antimicrobial activity in the skin of the channel catfish *Ictalurus punctatus*: characterization of broad-spectrum histone-like antimicrobial proteins [J]. *CMLS Cell Mol Life Sci*, 1998, **54**(5): 467—475

[7] Fernandes J M O, Kemp G D, Molle M G, *et al* Antimicrobial properties of histone H2A from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Biochem J*, 2002, **368**: 611—620

[8] Ebrana N, Julien S, Orange N, *et al* Isolation and characterization of novel glycoproteins from fish epidermal mucus: correlation between their pore-forming properties and their antibacterial activities [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1467**(2): 271—280

[9] Bergsson G, Agerberth B, Jömvall H, *et al* Isolation and identification of antimicrobial components from the epidermal mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*) [J]. *FEBS J*, 2005, **272**: 4960—4969

[10] Kitani Y, Tsukamoto C, Zhang G H, *et al* Identification of an antibacterial protein as L-amino acid oxidase in the skin mucus of rockfish *Sebastes schlegelii* [J]. *FEBS J*, 2007, **274**: 125—136

[11] Nagashima Y, Kikuchi N, Shimakura K, *et al* Purification and characterization of an antibacterial protein in the skin secretion of rockfish *Sebastes schlegelii* [J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2003, **136**(1): 63—71

[12] Tasumi S, Yang W J, Usami T, *et al* Characteristics and primary structure of a galectin in the skin mucus of the Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. *Dev Comp Immunol*, 2004, **28**(4): 325—335

[13] Tasumi S, Ohira T, Kawazoe I, *et al* Primary structure and characteristics of a lectin from skin mucus of the Japanese eel *Anguilla japonica* [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277**(30): 27305—27311

[14] Tsutsui S, Tasumi S, Suetake H, *et al* Lectins homologous to those of monocotyledonous plants in the skin mucus and intestine of pufferfish, *Fugu rubripes* [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278**(23): 20882—20889

[15] Ebrana N, Julieta S, Orange N, *et al* Pore-forming properties

- and antibacterial activity of proteins extracted from epidermal mucus of fish [J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 1999, **122**(2): 181—189
- [16] Vidler H, Geertjes G J, Videler J J. Biochemical characteristics and antibiotic properties of the mucous envelope of the queen parrotfish [J]. *J Fish Biol*, 1999, **54**: 1124—1127
- [17] Ogawa T, Shirai T, Shionyu-Mitsuyama C, *et al* The speciation of conger eel galectins by rapid adaptive evolution [J]. *Glycoconj J*, 2004, **19**: 451—458
- [18] Nagashima Y, Sendo A, Shimakura K, *et al* Antibacterial factors in skin mucus of rabbitfishes [J]. *J Fish Biol*, 2001, **58**: 1761—1765
- [19] Salles C M C, Gagliano P, Leitão S A T, *et al* Identification and characterization of proteases from skin mucus of tambacu, a Neotropical hybrid fish [J]. *Fish Physiol Biochem*, 2007, **33**: 173—179
- [20] Kimura M, Hama Y, Sumi T, *et al* Characterization of a deaminated neuraminic acid-containing glycoprotein from the skin mucus of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. *J Biol Chem*, 1994, **269**(51): 32138—32143
- [21] Ma S Q. Research progress in glycobiology and glycoprotein [J]. *Journal of Nanjing Agricultural Technology College*, 2001, **17**(1): 4—8 [马盛群. 糖生物学与糖蛋白研究进展, 南京农学报, 2001, **17**(1): 4—8]
- [22] Dong X Z. The isolation, purification, characterization and bioactivity of an antimicrobial protein, MAAP, from the loach, *Misgurnus anguillicaudatus* [D]. Thesis for Doctor of Science. Huazhong University of Science and Technology, Wuhan. 2002 [董先智. 泥鳅抗菌蛋白 MAAP 的分离、纯化、表征及生物活性研究. 博士学位论文, 华中科技大学, 武汉. 2002]
- [23] Park C B, Lee J H, Park I Y, *et al* A novel antimicrobial peptide from the loach, *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. *FEBS Lett*, 1997, **411**(2): 173—178
- [24] Thompson S A, Tachibana K, Nakanishi K, *et al* Melittin-like peptides from the shark-repelling defense secretion of the sole *Pardachinus pavoninus* [J]. *Science*, 1986, **233**: 341—343
- [25] Cole A M, Weis P, Diamond G. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder [J]. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 12008—12013
- [26] Lüllers T, Birkemo G A, Nissen-Meyer J, *et al* Proline conformation-dependent antimicrobial activity of a proline-rich histone H1 N-terminal peptide fragment isolated from the skin mucus of atlantic salmon [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, **49**: 2399—2406
- [27] Femandes J M O, Saint N, Kemp G D, *et al* Oncorhynchin III a potent antimicrobial peptide derived from the non-histone chromosomal protein H6 of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Biochem. J*, 2003, **373**: 621—628
- [28] Femandes J M O, Molle M G, Kemp G D, *et al* Isolation and characterization of oncorhynchin II, a histone H1-derived antimicrobial peptide from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Dev Comp Immunol*, 2004, **28**(2): 127—138
- [29] Lauth X, Shike H, Burus J C, *et al* Discovery and characterization of two isoforms of moronecidin, a novel antimicrobial peptides from hybrid striped bass [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 5030—5039
- [30] Birkemo G A, Lüllers T, Andersen P, *et al* Hippodin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, **1646**(1—2): 207—215
- [31] Zhou Q J, Shao J Z, Xiang L X. Progress in fish antibacterial peptide research [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29**(5): 682—685 [周庆军, 邵健忠, 项黎新. 鱼类抗菌肽的研究进展, 生物化学与生物物理进展, 2002, **29**(5): 682—685]
- [32] Park I Y, Park C B, Kim M S, *et al* Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish *Parasilurus asotus* [J]. *FEBS Lett*, 1998, **437**: 258—262
- [33] Yokota H, Nagashima Y, Shiomi K. Interaction of graministins with lipids and their antibacterial activity [J]. *Fish Sci*, 2001, **67**: 928—933
- [34] Lazarevici P, Primoril N, Loew L M. Purification and pore-forming activity of two hydrophobic polypeptides from the secretion of the Red Sea Moses sole (*Pardachinus marmoratus*) [J]. *J Biol Chem*, 1986, **261**(35): 16704—16713
- [35] Shai Y, Fox J, Caratsch C, *et al* Sequencing and synthesis of pardaxin, a polypeptide from the Red Sea Moses sole with ionophore activity [J]. *FEBS Lett*, 1988, **242**: 161—166
- [36] Oren Z, Shai Y. A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin: a pore-forming peptide isolated from mores sole fish *Pardachinus marmoratus* [J]. *Eur J Biochem*, 1996, **237**(1): 303—310
- [37] Cole A M, Darouiche R O, Legarda D, *et al* Characterization of a fish antimicrobial peptide: gene expression, subcellular localization, and spectrum of activity [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, **44**(8): 2039—2045
- [38] Zheng Y, Yu P, Liu Y R, *et al* Specificity of sugar-binding and cell agglutination of *Porphyra haitanensis* lectin [J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2002, **20**(2): 137—140 [郑怡, 余萍, 刘艳如, 等. 坛紫菜凝集素的糖结合专一性和细胞凝集作用, 武汉植物学研究, 2002, **20**(2): 137—140]