

中国林蛙皮肤抗菌肽抗菌的特性

姜丽丽 尚德静*

(辽宁师范大学生命科学院 大连 116029)

摘要: 从林蛙皮肤中分离到具有抗菌活性的多肽混合物——多肽 FⅢ。抑菌实验表明,林蛙皮肤中小分子活性肽对革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌都具有一定的抗菌作用,并且此粗提物的抗菌活性远远高于传统食品防腐剂苯甲酸钠和山梨酸钾的抗菌活性。

关键词: 林蛙;皮肤;抗菌肽;山梨酸钾

中图分类号: Q956 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2004)06-70-03

Antimicrobial Activity of Skin Antimicrobial Peptide in Chinese Forest Frogs

JIANG Li-Li SHANG De-Jing

(College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China)

Abstract: Fraction Ⅲ, the mixture of antimicrobial peptides was isolated from the skin of Chinese forest frogs. We showed that the bioactive peptides in the skin of forest frog had antimicrobial activity against both gram-positive bacteria and gram-negative bacteria. In addition, antimicrobial activity of fraction Ⅲ was stronger than that of sorbic acid potassium salt, which is used as a traditional food preservative.

Key words: Chinese forest frog; Skin; Antimicrobial peptide; Sorbic acid potassium salt

两栖类是宝贵的自然资源,它们的皮肤中含有大量的分子结构特殊、功能复杂多样的生物活性物质,是有待开发的药物宝库。尤其是两栖动物皮肤中含有的多肽无论是种类还是数量都特别的丰富^[1],并且存在于两栖类皮肤中的大多数生物活性肽都能在哺乳动物中找到它们的对应物,但这些生物活性肽在两栖类中的含量却是哺乳类的 10 万倍^[2]。抗菌肽(antimicrobial peptides)是动物体内诱导产生的、广泛存在于生物界中的一类生物活性肽,一般具有抗细菌或真菌的作用,有些还具有抗原虫、病毒或肿瘤细胞的功能^[3-7]。抗菌肽不仅抗菌谱广,对革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌都有抑制作用,而且对多种肿瘤细胞及动物实体瘤有明显的杀伤作用,且不破坏正常细胞。因此,抗菌肽有望成为新一代的抗菌、抗病毒以及抗肿瘤药物^[5]。有关抗菌肽的开发与应用研究已经成为国内外昆虫学、植物学、生理学、药理学研究的热点。本实验从中国林蛙皮肤中提取出含有抗菌活性多肽的组份,并对其抗菌活性进行了初步的研究,以期为林蛙的综合开发利

用提供资料。

1 材料与方 法

1.1 材料 林蛙(*Rana temporaria chensinensis*)来源于长白末麓的抚顺、本溪县等地山区。将林蛙毁髓后解剖,取新鲜蛙皮用于实验。抗菌试验菌株:大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)。

1.2 方法 将 10 g 新鲜的蛙皮用 160 ml 酸性乙醇抽提体系抽提,经凝胶层析得到有抗菌活性的多肽 FⅢ^[8-11]。方法如下:

新鲜蛙皮 $\xrightarrow{\text{酸性乙醇浸提 48 h}}$ 上清液冷冻干燥

* 通讯作者, E-mail: djshang@lnnu.edu.cn;

第一作者介绍 姜丽丽,女,24岁,硕士研究生;研究方向:生物化学。

收稿日期:2004-03-29,修回日期:2004-07-17

Sephadex G-50 凝胶层析

→得到3种组分分别为:多肽FⅠ、多肽FⅡ和多肽FⅢ。

其中,多肽FⅢ是小分子多肽,它在3种组分中所占的比例是78%左右。

抗菌活性的测定方法:采用滤纸片法(此方法是自己设计),细菌培养基为牛肉膏蛋白胨培养基。将4种细菌分别用无菌水洗下,显微计数后,将菌悬液稀释至浓度为 10^5 cfu/ml (colony-forming units, cfu)。吸取1 ml 菌悬液与适量的50℃左右的牛肉膏蛋白胨培养基在9 cm的培养皿中混匀,使每板培养基中的最终含菌量为 10^5 ,待培养基凝固后,将分别浸有不同浓度多肽FⅢ样

品液的无菌滤纸片成对称放置,并用浸有不同浓度山梨酸钾(分析纯)的无菌滤纸片作为阳性对照。样品液的浓度依次为:4、10、20 mg/ml;各培养皿中山梨酸钾的浓度分别为4、10、20、100、500 mg/ml。37℃恒温箱培养24 h,测定滤纸片周围的抑菌圈的直径。

2 结果

如图1所示,多肽FⅢ样品分别抑制大肠杆菌、短小芽孢杆菌、金黄葡萄球菌和蜡状芽孢杆菌4种不同菌种所产生的抑菌圈。

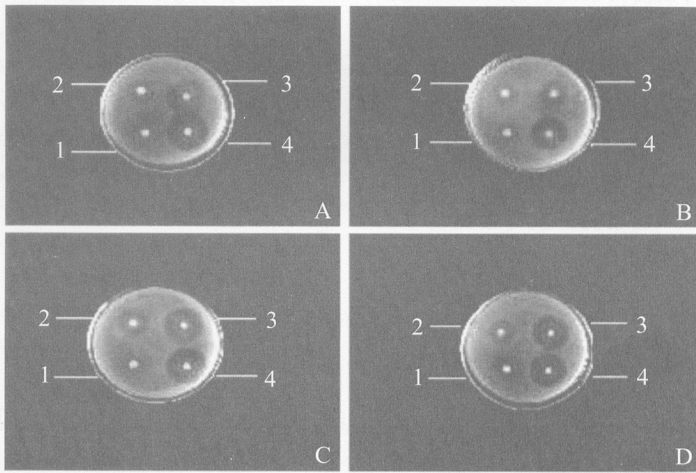


图1 多肽FⅢ分别抑制4种不同菌种产生的抑菌圈

A:抑制大肠杆菌;B:抑制短小芽孢杆菌;C:抑制金黄葡萄球菌;D:抑制蜡状芽孢杆菌

其中,1是浓度为500 mg/ml的山梨酸钾产生的抑菌圈;2是多肽FⅢ在浓度为4 mg/ml时产生的抑菌圈;3是多肽FⅢ在浓度为10 mg/ml时产生的抑菌圈;4是多肽FⅢ在浓度为20 mg/ml时产生的抑菌圈。

表1 不同浓度多肽FⅢ和山梨酸钾(分析纯)

溶液的抑菌结果

溶液浓度 (mg/ml)	抑菌圈直径(cm)							
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Bacillus cereus</i>		<i>Bacillus pumilus</i>	
	多肽FⅢ	山梨酸钾	多肽FⅢ	山梨酸钾	多肽FⅢ	山梨酸钾	多肽FⅢ	山梨酸钾
4	2.0	—	2.1	—	1.9	—	1.8	—
10	2.8	—	2.8	—	2.7	—	2.3	—
20	2.9	—	2.8	—	2.8	—	3.0	—
100	—	—	—	—	—	—	—	—
500	—	1.8	—	1.8	—	1.9	—	2.0

试验所用滤纸片的直径为:0.5 cm

苯甲酸钠(分析纯)溶液在浓度为4、10和20 mg/ml

时作用于大肠杆菌、短小芽孢杆菌、金黄葡萄球菌和蜡状芽孢杆菌4种不同菌种均没有抑菌圈产生。

由表1中可以看到,多肽FⅢ对革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌都有抑制作用。另外,还可以观察到,多肽FⅢ作用于大肠杆菌、金黄葡萄球菌和蜡状芽孢杆菌在浓度为4 mg/ml时所产生的抑菌圈直径和在浓度为10 mg/ml时所产生的抑菌圈的直径有较大的差异,而浓度为10 mg/ml和20 mg/ml时所产生的抑菌圈的直径差异几乎很小,这说明多肽FⅢ在浓度为10 mg/ml时基本上已经达到最好的抑菌效果,浓度再提高其抑菌效果也不会有很大变化。然而多肽FⅢ作用于短小芽孢杆菌时,在浓度为4、10和20 mg/ml所产生的抑菌圈的直径则形成了一定的梯度,在浓度为20 mg/ml时抑菌圈直径最大。由表1中不同浓度多肽FⅢ和山梨酸钾溶液的抑菌结果的对比可以看到:多肽FⅢ样品的抗菌活性明显好于苯甲酸钠和山梨酸钾的抗菌活性。山梨酸钾在浓度为100 mg/ml时对本实验中的4种菌种都并未

表现出任何的抗菌活性;而多肽 FⅢ 在浓度为 4 mg/ml 时就对其表现了较显著的抗菌活性。而且,山梨酸钾在浓度为 500 mg/ml 时的抑菌效果与多肽 FⅢ 在浓度为 4 mg/ml 时的抑菌效果基本相同。

3 讨论

抑菌实验结果表明,林蛙皮肤中的小分子抗菌活性肽具有较强的抗菌活性,并且它对革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌均具有抑制作用。通过与传统食品防腐剂苯钾酸钠和山梨酸钾抗菌活性的比较发现,本实验中所获得的林蛙皮肤的多肽粗提物——多肽 FⅢ 对所选用的 4 种菌种的抑制能力较强。而且,多肽 FⅢ 经一定的手段纯化后,它的抑菌活性会更高,这将是山梨酸钾等传统食品防腐剂所无法匹敌的,为开发出安全无毒副作用的天然食品防腐剂来取代传统的具有一定毒副作用的化学合成防腐剂奠定了基础。另外,大肠杆菌、金黄葡萄球菌和蜡状芽孢杆菌都是引起某些疾病的致病菌,因此也可以利用抗菌肽与常见抗生素作用机理不同,不易产生抗药菌株这一特性,将其开发成为新一代的抗菌药物^[12]。为此作者准备将已获得的多肽 FⅢ 纯化,对其抗菌活性做进一步的研究,希望可以为林蛙这一我国特有蛙种的综合利用作出一定贡献。

参 考 文 献

- [1] Erspamer V, Erspamer G F, Cej J M. Active peptides in the skins of two hundreds and thirty American amphibian species. *Biochem Physiol*, 1986, **85C**: 125 ~ 137.
- [2] Clarke B T. The natural history of amphibian skin secretions,

their normal function and potential medical applications. *Biol Rev*, 1997, **72**(3): 367 ~ 379.

- [3] 胡云龙, 赵学忠, 屈贤明. 抗菌肽的分子生物学研究进展. *生物工程进展*, 1997, **17**(3): 14 ~ 18.
- [4] 李恩民, 刘维全, 殷震. 抗菌肽的特性及应用前景. *中国药理学通报*, 1998, **14**(3): 209 ~ 211.
- [5] 赖仞, 叶文娟, 冉永禄等. 大蹼铃蟾皮肤分泌物中抗菌活性肽的分离纯化及性质. *动物学研究*, 1998, **19**(4): 257 ~ 262.
- [6] 徐科, 吉永华, 屈贤明. 穴居狼蛛毒中一个抗菌活性多肽的鉴定和纯化. *动物学报*, 1989, **35**(3): 300 ~ 305.
- [7] 赵东红, 戴祝英, 周亚开. 昆虫抗菌肽的功能、作用机理与分子生物学研究进展. *生物工程进展*, 1999, **19**(5): 14 ~ 18.
- [8] Amanda L Salmon, Laurence J M Cross, Alexandra E Irvine, et al. Peptide leucine arginine, a potent immunomodulatory peptide isolated and structurally characterized from the skin of the Northern Leopard frog, *Rana pipiens*. *Biological Chemistry*, 2001, **276**(13): 10 145 ~ 10 152.
- [9] Jadvinder Goraya, Wang Yuqi, Li Zhihong, et al. Peptides with antimicrobial activity from four different families isolated from the skins of the North American frogs *Rana iuteiventris*, *Rana berlandieri* and *pipiens*. *Eur J Biochem*, 2000, **267**: 894 ~ 900.
- [10] 于文会, 姜晓文. 中国林蛙皮肤抗菌肽的分离纯化及部分特性研究. *黑龙江畜牧兽医*, 2002, **865**(9): 1 004 ~ 1 034.
- [11] 袁德云, 王立梅, 胡耀辉. 林蛙皮肤抗菌肽的提取及某些特性的测定. *吉林农业大学学报*, 2001, **23**(2): 113 ~ 116.
- [12] 徐强, 华跃进, 徐步进等. 蛙类皮肤分泌物中的抗菌肽和抗癌肽. *动物学杂志*, 2002, **37**(2): 73 ~ 76.