

## 第一章 引言

细菌与真菌中有许多是致病菌，如金黄色葡萄球菌、艰难梭菌、大肠杆菌等，可以引发多种疾病。为了应对致病菌，抗生素被大量使用以杀死人体内或环境中的致病菌。但是在长期的抗生素使用后，出现了一些耐受抗生素的致病菌，导致超级致病菌横行，给人类健康、疾病治疗、灭菌杀菌造成了困难<sup>[1]</sup>。为此，对超级致病菌有抑制和杀伤作用的抑菌肽和杀菌肽逐渐被人们发现并加以利用。

### 1.1 抗生素的滥用导致超级致病菌横行

抗生素自诞生以来，在抑菌和杀菌方面起到了很有效的作用，至今仍被广泛应用。然而，长期使用和滥用抗生素，使得一些对抗生素具有耐药性的超级致病菌被选择出来并日趋流行。超级致病菌是一类能够对大部分抗生素都产生耐药性的致病菌，即能够抵抗抗生素，不被其杀死。超级致病菌的耐药性是由致病菌长期进化而来。由于超级致病菌能够抵抗大部分抗生素、难以被杀灭，引发感染后难以治疗，人类健康已受到极大的威胁。目前，较受关注的超级致病菌主要有：耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）、携带有 NDM-1 基因的大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌<sup>[2]</sup>和耐药念珠菌如耳道念珠菌<sup>[3]</sup>等。

人类、动物和环境之间皆可以互相传播超级致病菌。目前，人类感染超级致病菌不仅与人类自身滥用抗生素有关，还与对养殖动物滥用抗生素紧密相关。尤其是一些人畜共患的致病菌，如果人类与被感染动物皮肤接触或是食用被感染动物的肉，都有可能感染人畜共患超级致病菌。此外，长期食用残留有抗生素或含超级致病菌的肉类还会使人体内致病菌的耐药性增加<sup>[4]</sup>。目前，对养殖动物的超级致病菌进行防控已经成为一个广受关注的问题，既要对接有的超级致病菌进行防控，还要减少抗生素使用以防产生新的超级致病菌。为此，人们急需找到能够取代抗生素的药物，不会使致病菌产生耐药性的抑菌肽和杀菌肽逐渐被人们发现并加以利用。

### 1.2 抑菌肽研究进展

抑菌肽是一种具有抑菌功能的小肽物质，一般由几十个氨基酸组成，参与构成机体免疫系统。由于抑菌肽对细菌、真菌、寄生虫、病毒等有抑制作用，而且其抑菌能力可以应对超级致病菌，因此抑菌肽在医药行业等领域有较广泛的应用<sup>[5]</sup>。

抑菌肽种类繁多，来源广泛。根据来源可分为三大类，分别是来源于动物、微生物以及化学合成。迄今为止，已有 1500 多种不同来源的抑菌肽被发现<sup>[5]</sup>。由于抑菌肽具有抑菌活性，并且一部分抑菌肽是纯天然肽，使其能够作为一类潜在的抑菌工具和医疗药物。抑菌肽的作用范围主要是针对细菌和真菌。

抑菌肽的确切作用机制还在深入研究中，尚没有定论，目前主要有两类假说。其中一类假说的主要内容是，抑菌肽能够与细胞膜表面相互作用，之后形成跨膜电位，打破细胞的酸碱平衡，影响渗透压平衡，抑制呼吸作用；另一类假说是，抑菌肽在进入细胞之后，与细胞内的作用靶标结合，干扰细胞正常生理生化反应，从而抑制细菌生长繁殖<sup>[5]</sup>。

抑菌肽可用于临床、畜牧养殖、基因工程等方面，应用广泛，但抑菌肽仍存在一些问题与缺点：（1）抑菌活性与抑菌谱：不同抑菌肽在抑菌活性和抑菌谱方面既有相似也有很大的不同，并且和传统抗生素相比还是略显不足；（2）药用性能：在医药医疗应用中，由于抑菌肽的毒理性的研究尚不够深入，在给药方式、剂量和作用时间等方面还需要更深入的研究才能投入临床应用中；（3）生产加工：抑菌肽的生产方式主要有三种，分别是生物体中提取、基因工程和化学合成，但是从生物体中提取的抑菌肽量极微，操作难度大，成本高；而使用基因工程重组抑菌肽的表达量低，且常以融合蛋白形式表达，后期处理获得纯品的难度很大；化学合成方法得到的抑菌肽通常活性很低<sup>[5]</sup>。目前，抑菌肽的三种主要生产方式都还很难达到产业化的规模，不能满足市场需求。

以上这些缺点大大限制了抑菌肽应对超级致病菌的能力。应对超级致病菌，尚需一类易生产、更广谱、具有更高杀菌活性的物质。

### 1.3 杀菌肽研究进展

杀菌肽是最早在昆虫免疫系统发现、一类具有强抗菌活性、由 30 多个氨基酸组成的多肽。杀菌肽来源广泛，生物界中不仅真菌和细菌能够产生杀菌肽，哺乳动物体内亦存在类似的有杀菌活性的多肽<sup>[6]</sup>。图 1-1 显示杀菌肽来源于各界生物，如植物界、原生生物界等<sup>[6]</sup>。它的特殊空间结构可以使原核细胞膜形成孔洞，具有杀死原核生物以及一些低等真核生物的功能。另有研究报道，杀菌肽具有抗癌作用<sup>[7]</sup>，还参与炎症反应和伤口修复<sup>[8]</sup>。杀菌肽在疾病治疗、杀菌灭菌等方面具有研究价值和应用前景。

杀菌肽的杀菌机理是通过在细胞膜上形成孔洞，这种孔洞通常具有类似于离子通道的性质，使细胞与环境进行不正常的离子交换，导致细胞内外的渗透压发生变化，细胞内的离子比如钾离子和其他物质渗出，使细菌死亡。杀菌肽与细菌的细胞膜的作用过程还没有定论，主流假说如下：首先，在水相与细胞膜交界处，通过静电吸引，杀菌肽靠近磷脂双分子层，带正电荷的 N 端在此处聚集；之后，疏水的杀菌肽 C 端插入细胞膜中，细胞膜界处是双亲性  $\alpha$  螺旋滞留的位置；最后，双亲性的  $\alpha$  螺旋插入细胞膜中，因为  $\alpha$  螺旋同时具有亲水性和疏水性，会在细胞膜上形成孔洞，孔洞逐渐扩大，细胞内外渗透压改变，内容物流出，最后细胞死亡<sup>[9]</sup>。

杀菌肽具有来源广泛、作用机制明确、实效性强、可利用常见的工程菌株进行大规模生产等优点，在未来的研究中，可就其中多种杀菌肽进行直接利用或改造，为应对超级致病菌开拓了一条新思路。

Kingdoms	Type of organism	Producing organism	PFP	Extra- or intracellular	Target	Pore stoichiometry	Permeable to/ transloc. of	Reference (mostly reviews)	PFP class
Metazoans	Mammals	human, mouse,...	Perforin	Extra	Mammalian infected or malignant cells	~20	ions, ATP, granzymes?	(Law et al., 2010)	$\beta$ -PFP
	Mammals	human, mouse,...	C9	Extra	Bacteria, parasites		ions, ATP	(Kondos et al., 2010)	$\beta$ -PFP
	Tetrapods	human, mouse,...	Bax, Bak	Intra	Mitochondria	>18	ions	(Westphal et al., 2011)	$\alpha$ -PFP
	Sea anemone	<i>A. Equina</i>	Equinatoxin II	Extra	Eucaryotic cells		ions	(Kristan et al., 2009)	$\alpha$ -PFP
	Hydra	<i>C. viridissima</i>	Hydralysin	Extra	Eucaryotic cells		ions, ATP	(Sher et al., 2005)	$\beta$ -PFP
	Earthworm		Lysenin	Extra	Eucaryotic cells		ions, ATP	(Yamaji-Hasegawa et al., 2004)	$\beta$ -PFP
Plants	Plants	<i>E. contortiquum</i>	Enterolobin	Extra	Eucaryotic cells			(Sousa et al., 1994)	$\beta$ -PFP
Fungi	Mushroom		Pleurotolysin	Extra	Eucaryotic cells			(Tomita et al., 2004)	$\beta$ -PFP
Protists	Parasites	<i>T. gondii</i>	PLP1	Intra	Parasitophorous vacuole		ions, ATP	(Kafsack et al., 2009)	$\beta$ -PFP
Bacteria	Bacteria	<i>E. coli</i>	Colicin A	Extra	Bacteria		ions	(Lokey et al., 1994)	$\alpha$ -PFP
	Bacteria	<i>C. diphtheriae</i>	Translocation domain of Diphtheria toxin	Extra	Mammalian endosomes		ions, DT A subunit	(Rodrin et al., 2010)	$\alpha$ -PFP
	Bacteria	<i>E. coli</i>	ClyA	Extra	Mammalian cells	13-Dec	ions	(Effer et al., 2006)	$\alpha$ -PFP
	Bacteria	<i>S. aureus</i>	Alpha-hemolysin	Extra	Mammalian cells	7	ions, ATP	(Song et al., 1996)	$\alpha$ -PFP
	Bacteria	<i>V. cholerae</i>	Vibrio cholerae	Extra	Mammalian cells	7	ions, ATP	(De and Olson, 2011)	$\alpha$ -PFP
	Bacteria	<i>A. hydrophila</i>	Aerolysin	Extra	Mammalian cells	7	ions, ATP	(Abrami et al., 2000)	$\beta$ -PFP
	Bacteria	<i>C. septicum</i>	Alpha-toxin	Extra	Mammalian cells	7	ions, ATP	(Ballard et al., 1995)	$\beta$ -PFP
	Bacteria	<i>B. anthracis</i>	Protective Antigen PA	Intra	Mammalian	7 or 8	ions, Lethal and edema factors	(Collier, 2009)	$\beta$ -PFP
	Bacteria	<i>C. perfringens</i>	Perfringolysin O	Extra	Mammalian cells	>30	ions, ATP, proteins	(Feil et al., 2012)	$\beta$ -PFP
	Bacteria	<i>L. monocytogenes</i>	Listeriolysin O	Extra, Intra	Mammalian cells	>30	ions, ATP, proteins	(Hotze and Tweten, 2004)	$\beta$ -PFP
Bacteria	<i>S. intermedius</i>	Intermedilysin	Extra	Mammalian cells	>30	ions, ATP, proteins	(Feil et al., 2012)	$\beta$ -PFP	
Bacteria	<i>E. coli</i>	HlyA	Extra	Mammalian cells			(Linhartova et al., 2010)	$\alpha$ -PFP	

图 1-1 来源于各界生物的杀菌肽<sup>[6]</sup> Mirko Bischofberger, Ioan Iacovache, F. Gisou van der Goot. Pathogenic Pore-Forming Proteins: Function and Host Response. Cell Host & Microbe. 9-13-2012, 266-175.

## 1.4 新型广谱杀菌肽 PFP-101

综合上述考虑，希望利用已知理论基础和相关条件，从一种杀菌肽的作用机理出发，将该杀菌肽改造成为一种能够广谱杀菌——尤其是针对超级致病菌的工具。通过查阅相关文献，发现一种来源于人体细胞的杀菌肽 PFP-101 (Pore-Forming Protein-101)，利用该蛋白，开发一种广谱杀菌肽。该杀菌肽的作用机理与上述杀菌肽作用机理类似，即蛋白的活性 N 端通过在细胞膜上打孔，破坏细胞膜来使细胞死亡。该蛋白在人体内需经过特异蛋白酶切割，解除蛋白 C 端对 N 端的抑制后才具有打孔活性，即该蛋白的全长和 C 端结构域对细菌没有毒性，N 端结构域才是杀菌的关键。实验的主要思路为构建原核载体，转入大肠杆菌，诱导其表达并纯化 PFP101-FL 和 PFP101-N Terminus，验证 PFP101-FL 的无毒性和 PFP101-N Terminus 的毒性；改造 PFP101-FL，使其可以在胞外和胞内能够被蛋白酶切断并产生有毒性的 PFP101-N Terminus，达到从胞外和胞内杀菌的目的；之后，使用不同的表达载体，分别通过胞外和胞内给药的方式进行杀菌：对于胞外给药，可以通过直接诱导表达纯化 N 端以及诱导表达纯化改造后全长，使用蛋白酶 PreScission 酶切后获得 N 端这两种方式来获取杀菌肽，然后将纯化得到的 N 端利用多种致病菌以及超级致病菌进行外加式胞外杀菌实验，探究杀菌效果；对于胞内给药，可在现有噬菌体疗法的基础上，和杀菌肽的作用联合起来，杀死病原体，并且在此之后，除了有噬菌体携带杀菌肽表达，裂解病原体后释放的杀菌肽还可以继续发挥作用。

本项目的亮点在于,巧妙地利用蛋白酶切位点产生具有杀菌功能的多肽,而在酶切之前不对表达菌株产生毒性,因此有可能得到大量有效产物。预计开发的杀菌肽具有几点优势:(1)可控性:由于它具有自我抑制的特点,酶切前没有打孔活性,所以可以在工程菌中大量表达并获得产物;(2)广谱性:该杀菌肽药物靶标在病原菌中普遍存在,并且是对其存活所必需的细胞膜成分;(3)多重给药方式:该杀菌肽从胞内和胞外都能够杀死病原菌。

## 参考文献

1. 侯晓,吴润,蒲万霞.超级细菌及新药研发方向[J].动物医学进展,2018,39(10):102-106.
2. 郑璇,郑育洪.国内外超级细菌的研究进展及防控措施[J].中国畜牧兽医文摘.2012,28(1):69-75
3. 雷岩,张超,潘炜华,廖万清.耳道念珠菌感染现状与研究进展[J].中国真菌学杂志,2018,13(01):53-56.
4. 宁宜宝,宋立,张纯萍,曲志娜.一个值得高度关注的问题——动物源细菌耐药性[J].中国动物检疫,2013,30(12):19-23.
5. 李冠楠,夏雪娟,隆耀航,李姣蓉,武婧洁,朱勇.抗菌肽的研究进展及其应用[J].动物营养学报.2014,26(1):17-25
6. Mirko Bischofberger, Ioan Iacovache, F. Gisou van der Goot. Pathogenic Pore-Forming Proteins: Function and Host Response. Cell Host & Microbe. 9-13-2012,266-175.
7. 张云.孔道形成蛋白多肽(pore-forming proteins/peptides)代表新的宿主免疫策略以及作用通路和效应分子[A].中国毒理学会生物毒素毒理专业委员会、中国生物化学与分子生物学会天然毒素专业委员会.第12届生物毒素研究及医药应用学术大会论文集[C].中国毒理学会生物毒素毒理专业委员会、中国生物化学与分子生物学会天然毒素专业委员会:中国毒理学会,2015:2.
8. 李谋,杨小琳,赵金礼.抗菌肽在炎症治疗方面的进展[J].医学信息,2018,31(06):42-44.
9. 崔晓江,刘枝俏,田颖川,彭学贤.杀菌肽的研究进展及应用前景[J].生物化学与生物物理进展.1995,22(1):5-8.
10. 谭才邓,朱美娟,杜淑霞,姚勇芳.抑菌试验中抑菌圈法的比较研究[J].食品工业,2016,37(11):122-125.
11. 田双娥.三种不同抑菌圈试验法在牛至油抑菌评价中的应用研究[J].香料香精化妆品,2019(01):37-41.
12. Yang Xiang. Host-derived pore-forming toxin-like protein and trefoil factor complex protects the host against microbial infection[A]. College of Life Sciences, Hunan Normal University. Program & Abstracts of 10th IST Asia Pacific Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins[C]. College of Life Sciences, Hunan Normal University., 2014:1.
13. Vadia, S. et al. The pore-forming toxin listeriolysin O mediates a novel entry pathway of *L. monocytogenes* into human hepatocytes. PLOS Pathog. 7, e1002356 (2011).
14. Fenfang Wu, Bo Feng, Yong Ren, Di Wu, Yue Chen, Shengfeng Huang, Shangwu Chen & Anlong Xu. A pore-forming protein implements VLR-activated complement cytotoxicity in lamprey. Cell Discovery. 2017.33
15. Mostafa M. Elhilali, Peter Pommerville, Richard C. Yocum, Rosemina Merchant, Claus G. Roehrborn, Samuel R. Denmeade. Prospective, Randomized, Double-Blind, Vehicle Controlled, Multicenter Phase IIb Clinical Trial of the Pore Forming Protein PRX302 for Targeted Treatment of Symptomatic Benign Prostatic Hyperplasia[J]. The Journal of Urology, 2013, 189(4).
16. Katia Cosentino, Uris Ros, Ana J. García-Sáez. Assembling the puzzle: Oligomerization of  $\alpha$ -pore forming proteins in membranes[J]. BBA - Biomembranes, 2016, 1858(3).
17. Michelle A. Dunstone. The emerging role of pore forming proteins in cell biology and development[J]. Seminars in Cell and Developmental Biology, 2017.
18. Sonja D. Müller, Anna A. De Angelis, Torsten H. Walther, Stephan L. Grage, Christian Lange, Stanley J.

Opella, Anne S. Ulrich. Structural characterization of the pore forming protein TatA d of the twin-arginine translocase in membranes by solid-state <sup>15</sup>N-NMR[J]. BBA - Biomembranes,2007,1768(12).

19. Bisaggio R da C, de Castro S L, Barbosa H S, Brandão C de A, Persechini P M. Trypanosoma cruzi: resistance to the pore forming protein of cytotoxic lymphocytes--perforin.[J]. Experimental parasitology,1997,86(2).

20. Fuertes Gustavo, Giménez Diana, Esteban-Martin Santi, Garcia-Sález Anaj, Sánchez Orlando, Salgado Jesús. Role of membrane lipids for the activity of pore forming peptides and proteins.[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology,2010,677.