

## 蛇毒抗菌肽 Cathelicidin 对大肠杆菌抗菌性的研究

李思嫚<sup>1)</sup>, 高振华<sup>2)</sup>, 申吉泓<sup>2)</sup>

(1) 昆明医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 云南昆明 650500; 2) 昆明医科大学第一附属医院泌尿外科, 云南昆明 650032)

**[摘要]** **目的** 探讨蛇毒抗菌肽 (Cathelicidin) 和头孢哌酮舒巴坦对大肠杆菌的抗菌作用. **方法** 选用临床上感染最常见的两种致病菌普通大肠杆菌 (*E. coli* ATCC 25922) 和耐头孢菌素大肠杆菌, 分为 A 组 (普通大肠杆菌组)、B 组 (蛇毒抗菌肽 Cathelicidin 抗耐头孢菌素大肠杆菌组) 及 C 组 (头孢哌酮舒巴坦抗耐头孢菌素大肠杆菌组) 进行体外抑菌实验并得出 U 值 (抗菌活性单位). **结果** A 组中, 低浓度和高浓度头孢哌酮舒巴坦溶液的 U 分别为 (150 ± 10) U 和 (230 ± 20) U, 抗菌肽水溶液的 U 为 (60 ± 0) U; B 组中, 抗菌肽水溶液的 U 为 63.3 ± 11.5 U; C 组中, 低浓度和高浓度头孢哌酮舒巴坦溶液的 U 均为 (0 ± 0) U. **结论** 头孢哌酮舒巴坦对耐头孢菌素大肠杆菌的抗菌作用不明显, 但对普通大肠杆菌 (*E. coli* ATCC 25922) 的抗菌作用很明显; 蛇毒抗菌肽 (Cathelicidin) 对耐头孢菌素大肠杆菌、普通大肠杆菌的作用提示蛇毒抗菌肽 (Cathelicidin) 具有稳定的抗菌活性.

**[关键词]** 蛇毒抗菌肽; 大肠杆菌; 头孢哌酮

**[中图分类号]** Q28 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 10 - 0031 - 03

## The Antimicrobial Activity of Snake Venom Antimicrobial Peptide Cathelicidin on *E. coli*

LI Si - man<sup>1)</sup>, GAO Zhen - hua<sup>2)</sup>, SHEN Ji - hong<sup>2)</sup>

(1) Kunming Medical University Basic Medical Biochemistry and Molecular Biology Department of Kunming City, Yunnan Kunming 650500; 2) Kunming Medical College First Affiliated Hospital Uropoiesis Surgical Department, Yunnan Kunming 650032, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the antimicrobial activity of snake venom antimicrobial peptide (Cathelicidin) against *E. coli*. **Method** The two most common pathogens of the cephalosporin-resistant *E. coli* and *E. coli* ATCC 25922 in clinical infection were selected to evaluate the antimicrobial activity of snake venom antimicrobial peptide (Cathelicidin) against *E. coli*. **Result** The inhibitory activity of Cefoperazone and sulbactam on cephalosporin-resistant *E. coli* was not obvious, but was obvious on ordinary *E. coli* (*E. coli* ATCC 25922). The inhibitory activity of snake venom antimicrobial peptide (Cathelicidin) on cephalosporin-resistant *E. coli* and ordinary *E. coli* was obvious. **Conclusion** Snake venom antimicrobial peptide (Cathelicidin) has stable antibacterial activity.

**[Key words]** Snake venom antimicrobial peptide; *E. coli*; Cefoperazone

细菌感染是致病菌或条件致病菌侵入血循环中生长繁殖, 产生毒素和其他代谢产物所引起的急性全身性感染, 也是临床上最为常见的感染, 感染后选择合适的抗生素成为治疗的关键. 抗生素的大剂

量使用和滥用, 导致细菌的耐药性增强, 耐药细菌的种类增多, 甚至出现了超级耐药的新型菌种或病毒, 这些菌种或病毒感染的严重威胁着人类的健康和生命, 也是对人类提出的巨大挑战. 在中山附二

**[基金项目]** 昆明医科大学优势发展学科建设基金资助项目 (2007ynys05)

**[作者简介]** 李思嫚 (1981 ~), 女, 云南通海县人, 医学学士, 讲师, 主要从事外科肿瘤与分子生物学工作.

**[通讯作者]** 申吉泓. E-mail: kmsjh99@yahoo.com.cn

院对院内死亡病例的回顾中院内患者的感染死亡率达 32.3%，是院内患者死亡最常见的原因<sup>[1]</sup>。大肠杆菌是临床泌尿系感染中最常见的病原菌，头孢哌酮舒巴坦对大肠杆菌的治疗耐药率极低<sup>[2]</sup>。

近年来，对抗菌肽的研究成为了科学研究的热点。因其强大的抗菌、免疫调节等作用使得人们对其研究日益深入。中国科学院重点实验室首先发现了蛇毒来源的 Cathelicidin，作为抗临床耐药病原菌感染的候选药物分子，它具有自主的知识产权和极高的临床应用前景。在临床上，蛇毒抗菌肽 (Cathelicidin) 对很多的耐药菌种和病毒显示出其强大的体外抗菌活性，在抗菌过程中基本无溶血和细胞毒性，并且在血浆和高盐浓度的环境里依然保持了它的抗菌活性，具有极高的临床应用前景<sup>[3]</sup>。

本研究选用临床上感染最常见的 2 种致病菌普通大肠杆菌 (*E. coli* ATCC 25922) 和耐头孢菌素大肠杆菌，通过体外抑菌实验来探讨蛇毒抗菌肽 Cathelicidin 和头孢哌酮舒巴坦对大肠杆菌的抑菌作用，从而研究蛇毒来源的 Cathelicidin 作为一种新型的抗菌肽对临床常见菌种大肠杆菌的感染是否有稳定的抗菌作用，希望为将来临床上新型抗菌肽药物的应用打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 制备细菌** 用接种环将普通大肠埃希菌 (*E. coli* ATCC 25922) 和耐头孢菌素大肠埃希菌临床株分别加入 LB 培养液，摇床 37℃，180 r/min 12 h。次日早取 20 μL 隔夜接种的菌液加入 LB 培养液，37℃摇床 150 r/min 速摇 3 h。

**1.1.2 制备蛇毒抗菌肽 (Cathelicidin)** 成熟的蛇毒抗菌肽 (Cathelicidin) 结构简单，且无二硫键，仅由 30 个氨基酸组成。笔者合成的蛇毒抗菌肽 (Cathelicidin) 纯度高于 95% 其氨基酸序列为 KFFKCLKNSVKKRAKFFKKPRVIGVSIPF。

### 1.2 方法

采用琼脂糖双层打孔法来进行 A、B 和 C 3 个组抗菌活性的检测<sup>[4]</sup>，实验具体分组为：A 组 (普通大肠杆菌组)、B 组 (蛇毒抗菌肽 Cathelicidin 抗耐头孢菌素大肠杆菌组) 及 C 组 (头孢哌酮舒巴坦抗耐头孢菌素大肠杆菌组)。将 5 μL 菌液 (处于对数生长期) 加入到 42℃ 的底层培养基 (1 mL 10 mM 柠檬酸碳酸氢盐缓冲液，Type I (A6013-100G)，9 mL dH<sub>2</sub>O，1 g 琼脂糖，100 顶层

胶液) 摇匀后倒入培养皿中，待底层胶凝固后打 4 个 3 mm 的圆孔。A 组：2 孔中每孔加入 5 μL 相同浓度的抗菌肽水溶液 (4 mg/mL)，另 2 孔为阳性对照，分别加入 5 μL 不同浓度的头孢哌酮舒巴坦溶液 (30 mg/mL、60 mg/mL)。B 组：4 孔分别加入 5 μL 相同浓度的抗菌肽水溶液 (4 mg/mL)。C 组：4 孔分别加入 5 μL 相同浓度的头孢哌酮舒巴坦溶液 (30 mg/mL)。在 37℃ 无菌恒温培养箱中孵育 3 h 后覆盖上顶层胶 (6 g 胰蛋白胍大豆肉汤，Type I (A6013-100G)，1 g 琼脂糖，10 mL dH<sub>2</sub>O)，继续 37℃ 无菌孵育 15 h。测量培养皿中小孔四周无菌斑区域透明环的直径后计算 U 值 (抗菌活性单位)， $U = [\text{抗菌环直径 (mm)} - 3] \times 10$ 。为保障实验的准确性，需重复实验 3 次，并取 3 次实验所得 U 值的平均数。

### 1.3 统计学处理

数据采用 SPSS 统计软件进行统计学处理，资料采用均数标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。

## 2 结果

普通大肠杆菌组中，可见普通大肠杆菌的生长在头孢哌酮舒巴坦和蛇毒抗菌肽 (Cathelicidin) 的环境中受到抑制，提示笔者头孢哌酮舒巴坦和蛇毒抗菌肽 (Cathelicidin) 对普通大肠杆菌均有抗菌作用，且不同浓度的头孢哌酮舒巴坦中，其浓度越高，抑菌环就越大，抗菌作用也就越强 (见图 1A、表 1)。蛇毒抗菌肽 Cathelicidin 抗耐头孢菌素大肠杆菌组中，可见耐头孢菌素大肠杆菌的生长在蛇毒抗菌肽 Cathelicidin 的环境中受到抑制，提示笔者蛇毒抗菌肽 Cathelicidin 对耐头孢菌素大肠杆菌有抗菌作用 (见图 1B、表 1)。头孢哌酮舒巴坦抗耐头孢菌素大肠杆菌组中，可见耐头孢菌素大肠杆菌的生长在不同浓度的头孢哌酮舒巴坦环境中未受到抑制，提示笔者头孢哌酮舒巴坦对耐头孢菌素大肠杆菌无明显抗菌作用 (见图 1C、表 1)。结合 3 个体外实验组的结果分析，提示笔者蛇毒抗菌肽 Cathelicidin 对普通大肠杆菌及耐头孢菌素大肠杆菌均有稳定的抑菌作用。

## 3 讨论

本实验通过琼脂糖双层打孔法进行了 3 个组的体外实验，实验效果良好。在普通大肠杆菌组中，浓度为 0.15 mg 的头孢哌酮舒巴坦溶液 (低浓度) 抗菌活性 U 平均值为  $(150 \pm 10) U$ ，浓度为 0.18

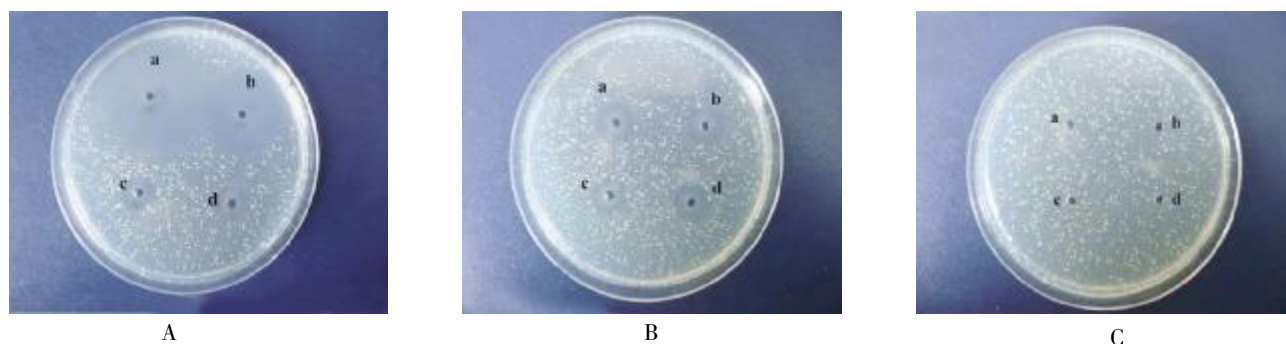


图 1 3 个实验组的体外抑菌环图

Fig. 1 The bacteriostatic ring diagram in three groups

a 液为头孢哌酮舒巴坦溶液; b 液为抗菌肽水溶液. 图 A 为 A 组 (普通大肠杆菌组): a 孔为 a 液 0.18 mg/孔, b 孔为 a 液 0.15 mg/孔, c 孔为 b 液 0.02 mg/孔, d 孔为 b 液 0.02 mg/孔. 图 B 为 B 组 (蛇毒抗菌肽 Cathelicidin 抗耐头孢菌素大肠杆菌组), a、b、c、d 4 孔均为 b 液 0.2 mg/孔. 图 C 为 C 组 (头孢哌酮舒巴坦抗耐头孢菌素大肠杆菌组), a、b 孔均为 a 液 0.18 mg/孔; c、d 孔均为 a 液 0.15 mg/孔.

表 1 A 组、B 组及 C 组的抗菌活性 ( $\bar{x} \pm s$ )Tab. 1 The antibacterial activity of A, B and C group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	抗菌活性 U/孔			
	a 孔	b 孔	c 孔	d 孔
A 组	230 ± 20	150 ± 10	63.3 ± 5.78	60 ± 0
B 组	56.7 ± 5.78	63.3 ± 11.5	53.3 ± 5.8	63.3 ± 11.5
C 组	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

注: A 组为普通大肠杆菌组、B 组为蛇毒抗菌肽 Cathelicidin 抗耐头孢菌素大肠杆菌组、C 组为头孢哌酮舒巴坦抗耐头孢菌素大肠杆菌组. a、b、c、d 孔所加溶液见图 1 说明.

mg 的头孢哌酮舒巴坦溶液 (高浓度) 抗菌活性 U 平均值为 (230 ± 20) U, 2 孔浓度均为 0.02 mg 的抗菌肽水溶液抗菌活性 U 平均值分别为 (60 ± 0) U 和 (63.3 ± 5.78) U. 在蛇毒抗菌肽 Cathelicidin 抗耐头孢菌素大肠杆菌组中, 4 孔浓度均为 0.18 mg 的抗菌肽水溶液抗菌活性 U 平均值分别为 (63.3 ± 11.5) U、(53.3 ± 5.8) U、(63.3 ± 11.5) U、(56.7 ± 5.78) U. 在头孢哌酮舒巴坦抗耐头孢菌素大肠杆菌组中, 2 孔浓度均为 0.15 mg 的头孢哌酮舒巴坦溶液抗菌活性 U 平均值均为 (0 ± 0) U; 2 孔浓度均为 0.18 mg 的头孢哌酮舒巴坦溶液抗菌活性 U 平均值均是 (0 ± 0) U. 提示笔者蛇毒抗菌肽 Cathelicidin 对普通大肠杆菌 (E. coli ATCC 25922) 和耐头孢菌素大肠杆菌都有明显且稳定的抗菌作用. 头孢哌酮舒巴坦对普通大肠杆菌 (E. coli ATCC 25922) 有明显的抗菌作用, 且头孢哌酮浓度越高抗菌作用就越强, 但其对耐头孢菌素大肠杆菌无明显抗菌作用.

3 组体外抑菌实验提示笔者, 蛇毒来源的 Cathelicidin 在体外具有稳定而良好的抗菌活性, 对

耐药头孢菌素大肠杆菌和普通大肠杆菌均有明显的抑制作用. 蛇毒来源的 Cathelicidin 抗菌研究为抵抗耐药菌种和病毒提供了有效的依据, 为临床细菌感染的治疗提供了新的方向, 为临床耐药性抗生素的进一步研究打下了基础.

#### [参考文献]

- [1] 梁翠群, 钟志海, 刘小珍. 死亡病例医院内感染情况分析[J]. 中国病案, 2003, 4(7): 44 - 44, 15.
- [2] 吴振安. 泌尿系感染常见病原菌分布及大肠埃希菌耐药性分析[J]. 检验医学与临床, 2007, 4(11): 1 035 - 1 036.
- [3] ZHAO H, GAN T X, LIU X D, et al. Identification and characterization of novel reptile cathelicidins from elapid snakes[J]. Peptides, 2008, 29(10): 1 685 - 1 691.
- [4] LEHRER R I, ROSENMAN M, HARWING S S, et al. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides[J]. Immunol Methods, 1991, 137(2): 167 - 173.

(2012 - 08 - 01 收稿)