

## 蛇毒抗菌肽 OH-CATH 在血浆环境中对大肠杆菌的抗菌作用

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

(1) 昆明医科大学第一附属医院泌尿外科, 云南昆明 650031; 2) 昆明医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 云南呈贡 650500)

**[摘要]** **目的** 研究蛇毒抗菌肽 OH-CATH 在血浆环境中是否会失去抑菌活性. **方法** 向含血浆 LB (B 组) 和不含血浆 LB (A 组) 中加入不同剂量的蛇毒抗菌肽 OH-CATH, 使抗菌肽的终浓度为 0  $\mu\text{g/mL}$ 、1  $\mu\text{g/mL}$ 、2  $\mu\text{g/mL}$ 、4  $\mu\text{g/mL}$ 、8  $\mu\text{g/mL}$ 、16  $\mu\text{g/mL}$  和 32  $\mu\text{g/mL}$ , 再加入普通大肠埃希菌 (*E.coli* ATCC 25922) 培养后分别测定两组的 O.D 值. **结果** A 和 B 组 O.D 值对应点间比较无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 蛇毒抗菌肽 OH-CATH 的最小抑菌浓度 (MIC) 在 4 ~ 8  $\mu\text{g/mL}$  之间. **结论** 蛇毒抗菌肽 OH-CATH 在血浆环境中不会迅速降解而失活并且对大肠杆菌具有良好的抗菌效果.

**[关键词]** 蛇毒抗菌肽 OH-CATH; 大肠杆菌; 血浆

**[中图分类号]** Q28 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 11 - 0035 - 03

## The Antibacterial Effects of Snake Venom Antimicrobial Peptide OH-CATH on *E.coli* in the Presence of Plasma

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

(1) Dept. of Urinary Surgery, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032; 2) Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

**[Abstract]** **Objective** To research whether venom antimicrobial peptide OH-CATH will lose anti-bacterial activity in plasma environment. **Method** We added different doses of snake venom antimicrobial peptide OH-CATH in LB with (Group B) and without plasma (Group A) to get final concentration of antimicrobial peptides including 0  $\mu\text{g/mL}$ , 1  $\mu\text{g/mL}$ , 2  $\mu\text{g/mL}$ , 4  $\mu\text{g/mL}$ , 8  $\mu\text{g/mL}$ , 16  $\mu\text{g/mL}$  and 32  $\mu\text{g/mL}$ , and added *E.coli* ATCC25922 in each EP which were then cultured, and the OD values were detected. Results There was no significant differences in OD value of the corresponding point between group A and B ( $P > 0.05$ ). The MIC of snake venom OH-CATH antimicrobial peptides was at the range of 4 ~ 8  $\mu\text{g/mL}$ . **Conclusion** Venom antibacterial peptide OH-CATH will not be rapidly degraded in the plasma environment and be inactivated, and has good antibacterial effect on *E.coli*.

**[Key words]** Snake venom antimicrobial peptide OH-CATH; *E.coli*; Plasm

Cathelicidin 是存在于哺乳动物体内的一类抗菌肽, 也是人体内的抗菌肽, 人体天然免疫系统最终要的重要组成部分就是 Cathelicidin, 它具有多种生物学功能, 例如促进创伤修复

除, 抑制组织损伤, 结合内毒素, 诱导血管生成和抑菌活性等, 其中 Cathelicidin 的抑菌活性是其最重要的功能, 也是临床应用研究的重点<sup>[1]</sup>. Cathelicidin 抗菌肽的螺旋度、整体疏水性、两亲

**[基金项目]** 云南省应用基础研究基金资助项目 (2011FZ117)

**[作者简介]** 高振华 (1982~), 男, 云南昆明市人, 硕士, 住院医师, 主要从事泌尿外科肿瘤研究工作.

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

性以及净正电荷数等结构参数都是影响抗菌活性、抗菌谱和溶血性的重要因素<sup>[2-5]</sup>。迄今为止被发现的人类 Cathelicidins 的家族成员是内源性抗菌肽 hCAP-18/LL-37, 人源性抗菌肽 LL-37 具有细胞毒性和很强的抑菌活性, 但它在融入血浆后很容易降解而失活, 所以人源性抗菌肽 LL-37 的抑菌活性不能在机体内发挥作用, 加之其细胞毒性就限制了它在临床上治疗细菌感染的应用及其它生物学功能的应用<sup>[6,7]</sup>。

本实验选用眼镜王蛇来源的蛇毒抗菌肽 OH-CATH 来探讨蛇毒来源的抗菌肽 Cathelicidin 在血浆环境中的其抗菌活性是否会降解失活, 为蛇毒抗菌肽 Cathelicidin 在全身性细菌感染的临床应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌液制备和细菌培养

**1.1.1 蛇毒抗菌肽 OH-CATH 的制备** 蛇毒抗菌肽 OH-CATH 由上海吉尔生化有限公司合成, 其氨基酸序列为 KFFKCLKNSVKKRAKKFFKKPRVIGV-SIPF, 纯度 > 95%。实验用样品由中国科学院“动物模型与人类疾病机理”重点实验室“生物毒素与人类疾病”学科组提供。

**1.1.2 大肠杆菌的培养** 将普通大肠埃希菌 (*E. coli* ATCC 25922, 来自中科院昆明动物所细胞库) 接种于普通 LB 液体培养基 37 °C 恒温摇床过夜培养, 次日用接种环将菌液“Z”字型划线接种于肉汤平板 37 °C 恒温箱过夜培养, 次日挑取单菌落接种于 LB 液体培养基 37 °C 过夜培养, 即可获得普通大肠埃希菌的纯种菌液, 整个过程确保为无菌操作。

### 1.2 蛇毒抗菌肽 OH-CATH 在血浆环境中的活性测定

取 1.5 mL EP 管 7 支, 分别加入 16  $\mu$ L、8  $\mu$ L、4  $\mu$ L、2  $\mu$ L、1  $\mu$ L、0.5  $\mu$ L、0  $\mu$ L 蛇毒抗菌肽 OH-CATH 液体 (原浓度 2 mg/mL), 对应加入 4  $\mu$ L、12  $\mu$ L、16  $\mu$ L、18  $\mu$ L、19  $\mu$ L、19.5  $\mu$ L、20  $\mu$ L 无菌 dH<sub>2</sub>O 后混匀, 将此 1-7 号 EP 管作为 A 组 (无血浆组), 分别从 A 组各 EP 管中转移 10  $\mu$ L 液体到 8-14 号空白 EP 管, 标记为 B 组 (血浆组)。分别加 90  $\mu$ L LB 液到 1-7 号 EP 管, 加 90  $\mu$ L 血浆到 8-14 号 EP 管, 最后再加 900  $\mu$ L LB 液到 1-14 号 EP 管中, 使每个 EP 管中蛇毒抗菌肽 OH-CATH 的终浓度分别为: 32  $\mu$ g/mL、16  $\mu$ g/mL、8  $\mu$ g/mL、

4  $\mu$ g/mL、2  $\mu$ g/mL、1  $\mu$ g/mL、0  $\mu$ g/mL。

室温放置 2 h 后向每 EP 管均加入对数生长期大肠杆菌 10  $\mu$ L (约  $5 \times 10^6$  cfu/mL), 37 °C 过夜培养。重复测 A 和 B 组 O.D 值 3 次取其平均值。

## 2 结果

不同浓度的抗菌肽蛇毒 OH-CATH 在不含血浆的 LB 和含有血浆的 LB 中对大肠杆菌抑制活性测定的 O.D 值 (见图 1) 可得, A 组和 B 组的最小抑菌浓度 (MIC):  $4 \mu\text{g/mL} \leq \text{MIC} \leq 8 \mu\text{g/mL}$ , A 组与 B 组各对应点比较无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

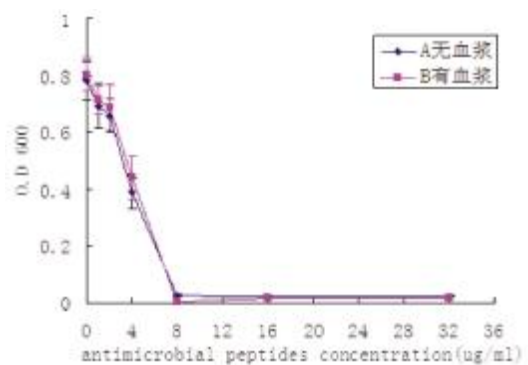


图 1 不同浓度的蛇毒抗菌肽 OH-CATH 在 A、B 组对大肠杆菌抑制活性测定 (OD 值)

Fig. 1 The inhibitory activity of different concentrations of OH-CATH on *Escherichia coli* in A and B groups

A: 为无血浆组; B: 为血浆组, A 组与 B 组各对应点比较无显著性差异 ( $P > 0.05$ ),  $4 \mu\text{g/mL} \leq \text{MIC} \leq 8 \mu\text{g/mL}$ 。

## 3 讨论

为模拟体内环境, 通过在 LB 培养液中加入或不加入血浆来进行分组后培养, 测定无血浆组 (A 组) 和血浆组 (B 组) 的 O.D 值可间接反映蛇毒抗菌肽 OH-CATH 对大肠杆菌的抑菌活性在有血浆环境中是否改变, 也可间接判断蛇毒抗菌肽 OH-CATH 在血浆环境中是否降解失活, 通过 O.D 值的曲线图还可判断蛇毒抗菌肽 OH-CATH 的最小抑菌浓度 (MIC)。从实验结果的分析可知血浆组 (A 组) 和无血浆组 (B 组) 在相同的蛇毒抗菌肽 OH-CATH 浓度条件下其 O.D 值对应点间比较无统计学差异 ( $P > 0.05$ ), 反应蛇毒抗菌肽 OH-CATH 在血浆环境中未降解失活, 对大肠杆菌仍显示出很强的抑制效果 ( $4 \mu\text{g/mL} \leq \text{MIC} \leq 8 \mu\text{g/mL}$ )。蛇毒抗菌肽 OH-CATH 在机体内不会迅速

降解而失活的性质, 对大肠杆菌有良好抗菌性的功能, 为蛇毒 cathelicidin 抗菌肽在机体内能够发挥很强的抑菌效果提供了理论基础, 为抗菌肽生物活性的进一步研究打下了基础, 为抗菌肽临床应用的提供了新的方向。

### [参考文献]

- [1] 李明. Cathelicidin 抗菌肽的特征及其应用[J]. 免疫学杂志, 2006, 3:345 - 347.
- [2] MATSUZAKI K. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides [J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1376(3):391 - 400.
- [3] DATHEM, WIEPRECHT T, NIKOLENKO H, et al. Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides [J]. FEBS Lett, 1997, 403(2):208 - 2123.
- [4] DATHE M. Structural features of helical antimicrobial peptides; their Potential to modulate Activity on model membranes and biological cells [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1999, 462(1-2):71 - 87.
- [5] GIANGASPERO A, SANDRI L, TOSSI A. Amphipathic alpha helical antimicrobial peptides [J]. Eur J Biochem, 2001, 268(21):5 589 - 5 600.
- [6] CIRIONI O, GIACOMETTI A, GHISELLI R, et al. Pretreatment of central venous catheters with the cathelicidin BMAP-28 enhances the efficacy of antistaphylococcal agents in the treatment of experimental catheter-related infection [J]. Peptides, 2006, 27:2 104 - 2 110.
- [7] PESCHEL A. How do bacteria resist human antimicrobial peptides [J]. Trends Microbiol, 2002, 10:179 - 186.

(2012 - 08 - 21 收稿)

(上接第 34 页)

- 研究进展 [1]. 吉林医学, 2011, 32(3):572 - 573.
- [4] WANG H, LI W, LI J, et al. The aqueous extract of a popular herbal nutrient supplement, *Angelica sinensis*, protects mice against lethal endotoxemia and sepsis [J]. J Nutr, 2006, 136(2):360 - 365.
- [5] 陈国千, 吴国荣, 赵琪, 等. 小檗碱对 HMGB1 胞外释放的影响 [J]. 中华中医药, 2009, 24(11):1 530 - 1 532.
- [6] XU M, DONG M Q, CAO F L, et al. Tanshinone IIA reduces lethality and acute lung injury in LPS-treated mice by inhibition of PIA2 activity [J]. European Journal of Pharmacology, 2009, 6076:194 - 200.

(2012 - 09 - 07 收稿)