

新型天蚕素 A-马盖宁杂合肽对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌杀菌作用的机制研究*

于龙魅, 杨田田, 王秀青[△]

宁夏医科大学 检验学院(银川 750004)

【摘要】 目的 研究天蚕素 A-马盖宁杂合肽对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)杀菌作用的作用机制。**方法** 采用微量稀释法测定杂合肽对 MRSA 的最低抑菌浓度(MIC)。通过透射电子显微镜观察该杂合肽作用于 MRSA 后细菌细胞膜的变化,采用原子吸收光谱仪检测待测菌液与杂合肽相互作用后细菌细胞外 K^+ 的浓度变化,用流式细胞仪分析杂合肽作用于 MRSA 后细菌细胞膜完整性的变化。**结果** 杂合肽对 MRSA 的 MIC 是 $64 \mu\text{g/mL}$ 。通过超微结构图像观察到细菌细胞膜破坏,杂合肽作用后细胞外钾离子浓度的升高,杂合肽引起碘化丙啶(PI)流入细胞质内,PI 着染阳性细胞的比率增高。**结论** 天蚕素 A-马盖宁杂合肽可能是通过破坏 MRSA 细胞膜,使细胞外钾离子浓度的升高同时导致 PI 进入胞质,细胞内部成分被破坏,从而起到杀菌作用。

【关键词】 天蚕素 A-马盖宁杂合肽 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 细胞膜 作用机制

CecropinA-Magainin, a New Hybrid Antibacterial Peptide Against Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* YU Long-mei, YANG Tian-tian, WANG Xiu-qing[△]. School of Clinical Laboratory of Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

[△] Corresponding author, E-mail: xiuqingwang1979@163.com

【Abstract】 Objective To study the mechanism of cecropinA-magainin treatment on the meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. **Methods** The activity of the hybrid antibacterial peptide against *Staphylococcus aureus* was evaluated by the minimum inhibitory concentration (MIC) test and its effect on the bacteria membrane changes were observed through transmission electron microscope. The concentration of K^+ of the tested bacterial liquid after interact with antibacterial peptide was detected with atomic absorption spectrometer. The changes of the treated bacteria biofilm was also evaluated by using flow cytometry. **Results** The results demonstrated that the MIC of the peptide against *Staphylococcus aureus* was $64 \mu\text{g/mL}$. The ultrastructure changes of the meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* membrane and the rising concentration of intracellular K^+ were observed. And increased number of PI positive cells was also observed after hybrid antibacterial peptide treatment. **Conclusion** The hybrid antibacterial peptide could kill the meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* by damage the treated bacteria membrane.

【Key words】 CecropinA-magainin hybrid peptide Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* Membrane Mechanism of action

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)是医院感染的重要致病菌之一,对青霉素、红霉素、庆大霉素、左氧氟沙星等常用抗生素均具有较高的耐药率,对抗 MRSA 感染已经成为临床治疗的难点^[1,2]。因此研发新的抗菌药物对抗 MRSA 也成为亟待解决的难题。而抗菌肽的发现为研制新的抵抗 MRSA 提供了新的思路和方法。

抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)是广泛存在于生物体内,由特定基因编码产生,具有抵御外

界微生物侵害及清除体内突变细胞作用的一类小分子多肽,是生物天然免疫防御系统的重要组成部分^[3,4]。天蚕素 A-马盖宁是抗菌作用比较强的两种阳离子小抗菌肽,本研究团队前期研究结果显示:该杂合肽对 G^+ 及 G^- 菌均具有良好的抑制和杀灭作用,且突变后天蚕素 A-马盖宁杂合肽对金黄色葡萄球菌包括从临床分离的 MRSA 活性均有不同程度的提高^[5]。但是该类杂合突变杂合肽对 MRSA 的作用机制目前仍不清楚,我们推测该杂合突变杂合肽可能作用于 MRSA 的细胞膜,通过破坏细菌细胞膜而起到抑菌作用。因此我们拟通过测定细菌细胞膜外钾离子浓度的变化来判断细菌细胞膜的改变,并通过透射电子显微镜及流式细胞仪观察细菌细胞

* 国家自然科学基金(No. 31360622)资助

[△] 通讯作者, E-mail: xiuqingwang1979@163.com

膜的完整性,为明确其作用机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

天蚕素 A-马盖宁杂合肽购买于上海楚肽生物合成有限公司;MRSA 由宁夏医科大学总医院医学检验中心提供;碘化丙啶(PI)购自 Sigma 公司;流式细胞仪 FACS Calibur 购自美国 BD 公司;H-7500 透射电镜购自日本日立公司;原子吸收光谱仪购自上海公司。

1.2 杂合肽最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)的测定

将 MRSA 培养至对数生长期,收集菌液。于 4 000 r/min 下离心 10 min,用生理盐水重悬至菌液浓度为 0.5 麦氏比浊。将杂合肽配成 512 $\mu\text{g/mL}$ 的母液后,用 LB 液体培养基倍比稀释到 1 $\mu\text{g/mL}$ 。取 100 μL 经倍比稀释后的杂合肽母液与 100 μL 待测菌液混匀,然后将此混合液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,在 600 nm 波长下用酶标仪测定其吸光值(A_{600}),以 PBS 缓冲溶液为对照组。将吸光值不再增加的杂合肽浓度记为 MIC。实验重复 3 次。

1.3 透射电镜及流式细胞仪观察杂合肽作用于细菌后细胞膜的变化

将 MRSA 培养至对数生长期,收集菌液。将终浓度为 MIC 的杂合肽加入菌液,37 $^{\circ}\text{C}$ 分别孵育 1 h、2 h、3 h 和 4 h。将等渗生理盐水加入菌液作为空白对照。作用后的细菌用 2.5% 戊二醛前固定液固定 2 次。然后用磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L pH7.4)漂洗 3 次。再用 1% 锇酸后固定 2~3 h。用磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L pH7.4)再次漂洗 3 次。依次用 30%、50%、70%、80%、90%、100% 浓度的乙醇以及环氧丙烷脱水。用环氧丙烷:树脂=1:1 渗透 2 h。将渗透好的样品加入胶囊中随后向胶囊中加入包埋剂树脂,加满位置,贴上标签。放入烤箱中 35 $^{\circ}\text{C}$ 6 h,42 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,60 $^{\circ}\text{C}$ 48 h 进行烘烤。Leica UC6 超薄切片机进行超薄切片,将带状切片捞到以 Fomavar(2% 聚乙烯醇缩聚甲醛)作为支持膜的铜网上,放入切片盒中,自然干燥^[6]。用 2% 的乙酸双氧钼和柠檬酸铅染色^[7]。使用 H7650 透射电镜,观察超薄切片。即可获得天蚕素 A-马盖宁杂合肽作用于 MRSA 后的超微结构。

同时,我们还采用流式细胞仪观察杂合肽对细菌细胞膜完整性的影响。在各组菌液中加入 PI 染液至终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min 后

离心,用生理盐水洗去多余的 PI 并用 1 mL 生理盐水重悬,上流式细胞仪检测 PI 着染阳性的细菌数目。

1.4 杂合肽作用后细菌细胞外 K^{+} 浓度变化

1.4.1 杂合肽作用不同时间对细菌胞外钾离子的影响 将 MRSA 培养至对数生长期,收集菌液。将终浓度为 MIC 的杂合肽加入菌液,37 $^{\circ}\text{C}$ 分别孵育 30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h 和 12 h。将 1 mL 样本与 3 mL 混酸(硝酸:高氯酸=4:1)加入去离子的消解管中。对照组为生理盐水组。混匀,过夜,次日,在消解管中梯度消解(温度 60~130 $^{\circ}\text{C}$),消解至管中剩下结晶为止,若结晶出现深色,再加入几滴混酸进行消解;用去离子水冲洗结晶,将其转入 10 mL 的具塞试管中,定容至 10 mL,测定杂合肽作用后细胞外钾离子的浓度。实验重复 3 次。

1.4.2 不同浓度杂合肽对细菌胞外钾离子的影响 将 MRSA 培养至对数生长期,收集菌液。将杂合肽加入菌液,终浓度分别为 MIC、2 MIC、4 MIC、6 MIC、8 MIC 和 10 MIC,37 $^{\circ}\text{C}$ 分别孵育 2 h。将 1 mL 样本与 3 mL 混酸(硝酸:高氯酸=4:1)加入去离子的消解管中。对照组为生理盐水组。混匀,过夜,次日,在消解管中梯度消解(温度 60~130 $^{\circ}\text{C}$),消解至管中剩下结晶为止,若结晶出现深色,再加入几滴混酸进行消解;用去离子水冲洗结晶,将其转入 10 mL 的具塞试管中,定容至 10 mL,测定杂合肽作用后细胞外钾离子的浓度。实验重复 3 次。

1.5 统计学方法

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 t 检验对各实验组与其相应的空白对照组进行比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 杂合肽的 MIC 结果测定

实验结果如图 1 显示,在其浓度稀释到终浓度为 64 $\mu\text{g/mL}$ 时, A_{600} 不再增加,说明此时抗菌肽完全抑制了细菌的增长,因此杂合肽对细菌的 MIC 为 64 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 杂合肽对细菌细胞膜的影响

结果如图 2 所示。细菌经过杂合肽处理后,随着时间的延长,细胞膜逐步破裂,对照组可见细胞膜完整,作用 1 h 后可见细胞膜部分破裂,细菌细胞内的物质渗出到细胞外;作用 2 h 可见细胞膜破裂更加严重,中间拟核部分消失;作用 3 h 可见处于分裂

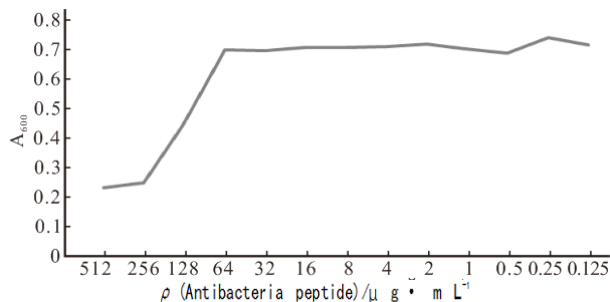


图 1 杂合肽对细菌的 MIC 测定

Fig 1 Determination of MIC of the metecillin-resistant *Staphylococcus aureus* treated by cecropinA-mangainin

对细菌细胞的破坏作用更完全,细胞膜及拟核都不清晰。

流式细胞仪检测结果显示,各杂合肽组 PI 阳离子数目高于对照组($P<0.05$),如图 3 所示,细菌经过杂合肽处理后,PI 的阳性细胞数目相比对照组明显增多,对照组仅有 7.87% 的 PI 染色。杂合肽作用后,随着时间的延长,细菌细胞膜的破坏越严重。在作用 2 h 时效果好。

2.3 杂合肽作用后 MRSA 细胞外钾离子浓度的变化

见图 4,显示杂合肽作用不同时间后细胞外钾离子的浓度高于对照组($P<0.05$),并且在 2 h 时杂

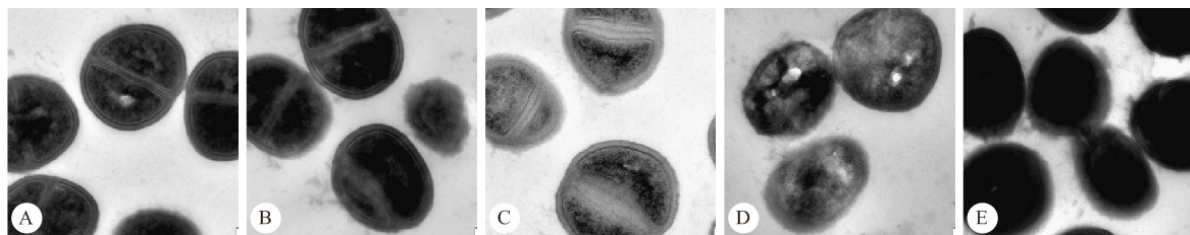


图 2 MRSA 经杂合肽作用后细胞膜变化的透射电镜图

Fig 2 Transmission electron micrographs of the control (A) and metecillin-resistant *Staphylococcus aureus* treated by cecropinA-mangainin for 1 h (B), 2 h (C), 3 h (D), 4 h (E)

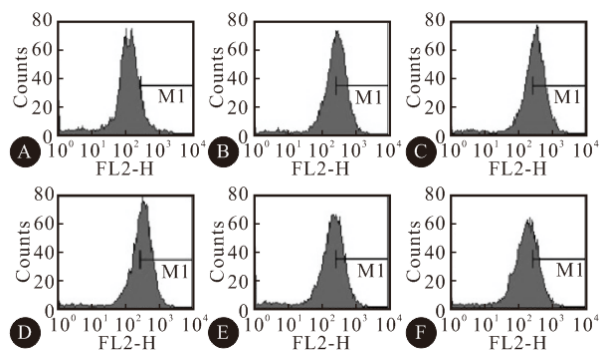


图 3 MRSA 经杂合肽作用后细胞膜完整性变化的流式细胞图

Fig 3 The results of flow cytometric analysis of control (A) and the metecillin-resistant *Staphylococcus aureus* treated by cecropinA-mangainin for 30 min (B), 1 h (C), 2 h (D), 3 h (E), 4 h (F)

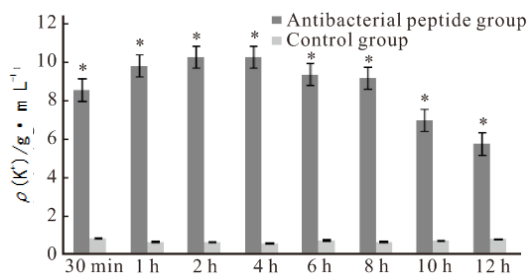


图 4 不同时间的杂合肽对细菌胞外钾离子的影响

Fig 4 The influence of K^+ in bacterial intracellular treated with antibacterial peptide at different times

* $P<0.05$, vs. control group

合肽的作用效果最佳。图 5 显示了不同浓度杂合肽作用后细胞外钾离子浓度高于对照组($P<0.05$),作用 2 h 后,可见随着杂合肽浓度的增加,细菌细胞外钾离子的浓度越高,说明杂合肽对细菌细胞膜的破坏作用效果越好。

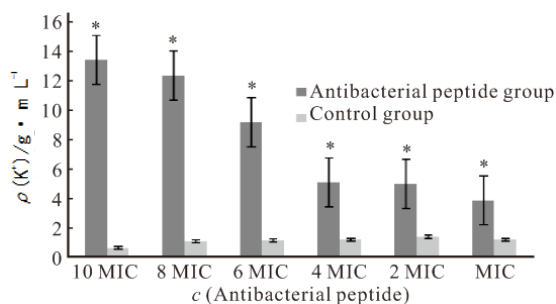


图 5 不同浓度的杂合肽对细菌胞外钾离子的影响

Fig 5 The influence of K^+ in bacterial intracellular treated with antibacterial peptide in different concentration

* $P<0.05$, vs. control group

3 讨论

MRSA 因其具有强大的致病因子以及耐药性,感染率日益升高,感染范围不断扩大,感染的过程越来越严重,已成为临床上的一个难题。天蚕素 A-马盖宁杂合肽作为新型肽类抗生素药物,具有广谱抗菌作用,对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都有很强

的抑菌作用。本实验中,我们通过透射电镜观察到,MRSA 经天蚕素 A-马盖宁杂合突变肽作用后,细菌细胞膜出现了破损,甚至在一定时间后,出现拟核部分消失,进而死亡。流式细胞仪检测结果也观察到,杂合肽作用后破坏了细菌细胞膜的完整性。另外杂合肽作用后细菌细胞膜外钾离子浓度大大提高证明了细胞膜被破坏。这 3 项实验证实了天蚕素 A-马盖宁杂合肽作用于 MRSA 细菌细胞膜,通过破坏细菌细胞膜完整性发挥抑菌作用。然而对于天蚕素 A-马盖宁杂合肽究竟以何种机制引起 MRSA 细菌细胞膜的破坏,我们还不清楚。目前已被推测提出的抗菌肽作用于细菌细胞膜的机制大致有 3 种:毡毯模型;桶板模型;孔洞模型^[8]。桶板和孔洞模型都是膜上形成孔洞,不同在于孔洞的结构。而毡毯模型则是当肽达到一定浓度时,以地毯方式覆盖在细胞膜上,破坏细胞膜的脂质双层曲率,导致破膜。

Li 等^[9]研究表明, Hp1404 是两亲性 α -螺旋阳离子抗菌肽,可以对抗包括 MRSA 的革兰氏阳性菌, Hp1404 在低浓度时渗入细菌细胞膜,高浓度时可以与膜相互作用并且形成孔道,其机制是与膜相互作用导致膜的横向扩张,最终形成孔洞导致膜的溶解。Fan 等^[10]研究表明, Ctriporin 作为一种新型对抗 MRSA 的阳离子抗菌肽,可以明显的减少细菌数量并且 Ctriporin 是通过快速溶解细胞的抗菌机制来有效对抗细菌。Hartmann 等^[11]研究结果表明, Gramicidin S 和 PGLa 两种抗菌肽首先通过静电作用与带阴离子电荷的细菌相结合,嵌入到菌膜的疏水区,进而引起膜的破坏和瓦解。刘唤明等^[12]研究纳豆菌脂肽,其可使金黄色葡萄球菌细胞膜通透性增加,或细胞膜形成孔洞导致细胞内物质泄漏,使细胞生长受到抑制,进而导致死亡。

由于本研究透镜下还观察到细胞内拟核和横壁消失,我们猜测杂合肽破坏细胞膜后有可能进一步与 MRSA 细菌细胞内物质发生相互作用,这也是我

们下一步准备进行研究的方

参 考 文 献

- 1 刘惠容, 林定忠. 临床标本耐甲氧西林金黄色葡萄球菌分布及药敏分析. 中国当代医药, 2011;18(10):70-71.
- 2 郑丽华, 张 静, 张旭霞等. 医院耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染的调查. 宁夏医学杂志, 2011;33(11):1052-1053.
- 3 Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacterial? Nat Rev Microbiol, 2005;3(3):238-250.
- 4 Jenssen H, Hamill P, Hancock RE. Peptide antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev, 2006;19(3):491-511.
- 5 Wang X, Zhu M, Zhang A, *et al.* Synthesis and secretory expression of hybrid antimicrobial peptide CecA-mag and its mutants in *Pichia pastoris*. Exp Biol Med (Maywood), 2012;237(3):312-317.
- 6 Wu CH, Zhang XF, Rui R, *et al.* Manufacturing of SEM and TEM samples for oocyle. Agricultural Science & Technology, 2009;10(5):110-112.
- 7 李伟秋, 刘少辉, 徐丹丹等. 一种人表皮黑素细胞透射电镜观察方法. 汕头大学医学院学报, 2013;1(26):19-21.
- 8 侯晓姝, 胡宗利, 陈国平等. 抗菌肽的抗菌机制及其临床应用. 微生物学通报, 2009;36(1):97-105.
- 9 Li Z, Xu X, Meng L, *et al.* Hp1404, a new antimicrobial peptide from the scorpion *Heterometrus petersii*. PLoS One, 2014;9(5):e97539. doi: 10.1371/journal.pone.0097539. eCollection 2014.
- 10 Fan Z, Cao L, He Y, *et al.* Ctriporin, a new anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* peptide from the venom of the scorpion *Cherilus tricotatus*. Antimicrob Agent Chemother, 2011;55(11):5220-5229.
- 11 Hartmann M, Berditsch M, Hawecker J, *et al.* Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides gramicidin S and PGLa as revealed by transmission and scanning electron microscopy. Antimicrob Agents Chemother, 2010;54(8):3132-3142.
- 12 刘唤明, 孙力军, 王雅玲等. 纳豆菌脂肽对金黄色葡萄球菌抑菌机理的研究. 食品工业科技, 2012;11(33):109-112.

(2014-07-20 收稿, 2014-11-05 修回)

编辑 汤 洁