

家蝇幼虫分泌型抗菌肽对细菌感染小鼠的影响

国果*, 吴建伟, 付萍, 张勇
(贵阳医学院, 贵阳 550004)

[摘要] **目的:**探讨家蝇幼虫分泌型抗菌肽对细菌感染小鼠的影响。**方法:**选用 BALB/c 小鼠,随机分为 3 组:抗菌肽预防性干预组(小鼠感染前 3 d 预防性给抗菌肽 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、治疗性干预组(感染后予抗菌肽 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和模型组(感染后予生理盐水),小鼠细菌感染方式为 ip 大肠杆菌液,给抗菌肽方式亦为 ip 给药,设正常小鼠为对照。分别检测以下指标:感染后 4, 12 h 各组小鼠腹腔液细菌数量;感染后 4, 8, 12, 24 h 小鼠外周血内毒素、一氧化氮(NO)含量及鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白细胞介素-6(IL-6)等细胞因子水平。**结果:**预防性给抗菌肽能明显减少小鼠腹腔液的细菌数量,同时小鼠外周血 TNF- α , IL-6, NO 及内毒素含量均明显低于模型组;治疗性给抗菌肽组小鼠腹腔液细菌数及外周血内毒素含量亦明显低于模型组,但对其他指标的干预作用较预防性给抗菌肽组弱。**结论:**家蝇幼虫分泌型抗菌肽 ip 给药对大肠杆菌 ip 感染小鼠具有一定的抑制作用。

[关键词] 家蝇幼虫;分泌物;抗菌肽;细菌感染

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)02-0165-04

Effect of Secreting Type Antibacterial Peptides from *Musca domestica* in Mice with Abdominal Infection

GUO Guo*, WU Jian-wei, FU Ping, ZHANG Yong
(Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of secreting type antibacterial peptides from *Musca domestica* Larvae in mice with abdominal infection. **Method:** Thirty-two BALB/c mice were selected and divided randomly into four groups. Experiment group 1 (prophylactic intervention of antibacterial peptide): $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ antibacterial peptide was administered prophylactic before bacterial infection for 3 days. Experiment group 2 (remedial intervention of antibacterial peptide): $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ antibacterial peptide was administered after bacterial infection. Model group: normal sodium was administered after bacterial infection. Normal mice were control. The number of bacteria in ascitic fluid was examined in 4 h and 12 h after bacterial administration. These contents were measured of plasma Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), nitric oxide (NO) and endotoxin in 4, 8, 12 h, and 24 h after bacterial infection. **Result:** There was a distinct content decrease of plasma TNF- α , IL-6, NO and endotoxin in antibacterial peptide pretreatment group compared with those in model group. In remedial intervention group, bacterial number in ascitic fluid and endotoxin content in peripheral blood were obviously lower than those in model group, while changes of other indexes were not as obvious as those in pretreatment group. **Conclusion:** The secreting type antibacterial peptides from *M. domestica* could show the immunoregulation in bacterial infection mice.

[Key words] *Musca domestica*; secretion; antibacterial peptide; bacterial infection

抗菌肽是存在于生物体内具有抵抗外界微生物侵害、消除体内突变细胞的小分子多肽,不仅对革兰

阳性菌、阴性菌、病毒、寄生虫和真菌等病原体具有杀伤作用^[1],而且在募集免疫细胞、增强先天免疫、

[收稿日期] 20110618(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30960343);贵州省教育厅自然科学基金项目(F2008-6);贵阳医学院院基金项目(C2007-2)

[通讯作者] * 国果,博士,副教授,从事昆虫免疫研究,E-mail: guog616@yahoo.com.cn

促进伤口愈合以及抗肿瘤^[2]等方面也发挥着重要作用。此外,在机体内,抗菌肽还可以作为药物载体运载药物^[3]。经过近 20 年的研究,已有超过 1 500 种肽被证实有高效广谱的抗菌活性和免疫调节活性,并有大量的药物进入临床试验阶段^[4]。

家蝇幼虫是传统中药中“五谷虫”的来源之一。五谷虫是一味传统的中药材,具有清热解毒的功效,可以用来治疗痈疽疮疡等疾患^[5]。已有的研究发现,家蝇幼虫血淋巴中含有抗菌肽和抗真菌肽^[6],家蝇幼虫的分泌物中存在抗多种植物病原菌的物质^[7]。我们用盐析-凝胶过滤层析结合反相高效液相色谱从家蝇幼虫分泌物中分离纯化到分泌型抗菌肽,体外证实了其对大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌的抗菌活性^[8],体内实验结果显示其能提高大肠埃希菌感染的小鼠血清溶菌酶含量,并能在一定程度上抑制感染小鼠外周血白细胞及中性粒细胞绝对值的降低趋势^[9-10]。本文利用大肠埃希菌感染小鼠的疾病动物模型,从给予家蝇幼虫分泌型抗菌肽干预后小鼠腹腔液细菌数量、外周血细胞因子变化等角度进一步研究抗菌肽对感染动物的影响,为探讨抗菌肽在动物体内的作用提供一定的实验依据。

1 材料

1.1 动物 BALB/c 小鼠,6~8 周龄,18~22 g,雌雄各半。由贵阳医学院实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(黔)2002-0001。

1.2 试剂 小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒,批号 26070503;小鼠白细胞介素-6 (IL-6) ELISA 试剂盒,批号 26070422;内毒素 ELISA 试剂盒,批号 29070601,均为美国 Rapidbio 公司产品;NO 检测试剂盒为南京建成有限公司生产,批号 20060711。其他试剂均为国产分析纯,实验用水为 Millipore-Q 超纯水。

1.3 抗菌肽样品 按照文献制备^[8]。

2 方法

2.1 分组与给药 取健康 BALB/c 小鼠随机分为 4 组,雌雄各半,每组 32 只。实验组 I (抗菌肽预防性干预组):抗菌肽($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) ip 3 d,第 4 天 ip 大肠埃希菌液($1 \times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$) 0.3 mL,30 min 后再给抗菌肽液 1 次($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$);实验组 II (抗菌肽治疗性干预组):ip 大肠埃希菌液后 30 min,予抗菌肽($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) ip 1 次。模型组:ip 大肠埃希菌液后 30 min,ip 予等剂量生理盐水。另设未予任何处理的正常小鼠作为空白对照。

2.2 腹腔液细菌计数 分别于感染大肠埃希菌后 4,12 h 处死各组小鼠 8 只,将小鼠浸泡于 75% 乙醇中 2 min,腹腔注射 2 mL 无菌生理盐水,轻揉腹部 2 min,无菌条件下剖开小鼠腹部,吸取小鼠腹腔液稀释一定倍数后用平板计数法检测其细菌数量。

2.3 ELISA 法测定血清 TNF- α , IL-6, 内毒素的含量 血清样品制备:在腹腔感染细菌后 4,8,12,24 h,每组各时间点分别取 8 只小鼠去眼球取血,血液 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min 后,离心 $3\,000 \times g$,10 min,吸取上层血清测定 TNF- α , IL-6, 内毒素的含量,按照试剂盒要求操作。

2.4 硝酸还原酶法测定血清中 NO 的含量 根据试剂盒使用说明书操作。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 11.5 统计软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间均数比较采用配对 t 检验,多组均数比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠腹腔液细菌计数 经腹腔感染细菌后 4 h,模型组小鼠腹腔液菌落计数达($4\,949 \pm 563$) $\text{CFU} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,12 h 后降低为($1\,594 \pm 238$) $\text{CFU} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,而实验组 I (预防性给抗菌肽)和实验组 II (治疗性给抗菌肽)4 h 小鼠腹腔液的细菌数分别为($2\,776 \pm 471$) $\text{CFU} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, ($3\,464 \pm 334$) $\text{CFU} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,12 h 后降为(252 ± 57) $\text{CFU} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, (384 ± 77) $\text{CFU} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,均明显少于模型组,其中以实验组 I 尤为明显,各实验组与模型组相比较均 $P < 0.01$;正常小鼠腹腔液未检测到细菌。

3.2 对细菌感染小鼠血清 TNF- α 含量的影响 感染细菌后,模型组小鼠 4 h 内血清 TNF- α 含量急剧上升,从正常小鼠的 $23.3 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加到 $158.56 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$,而给予家蝇幼虫分泌型抗菌肽后,实验组 I 4,8,12 h 及实验组 II 4,8 h 小鼠的 TNF- α 量与模型组相比较, $P < 0.05$,差异有显著性(表 1)。

3.3 对细菌感染小鼠血清 IL-6 含量的影响 细菌感染后,模型组小鼠血清 IL-6 含量较正常对照明显增高(表 2),而且到感染后 8 h 还有缓慢增高趋势,24 h 后虽有一定程度的降低,但仍明显高于正常小鼠。与模型组比较,实验组 I 各时间点及实验组 II 4,8,12 h 小鼠的血清 IL-6 含量差异有显著性($P < 0.05$)。

3.4 对小鼠血清 NO 含量的影响 细菌感染后,模型组小鼠血清 NO 含量迅速升高,至感染后 8 h 达峰值。从表 3 可见各实验组小鼠血清 NO 含量均低于

表1 抗菌肽 ip 给药对小鼠血清 TNF- α 含量的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)ng·L⁻¹

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	4 h	8 h	12 h	24 h
预防性给药	10	118.55 ± 36.91 ¹⁾	122.83 ± 21.99 ¹⁾	85.26 ± 23.18 ¹⁾	36.79 ± 12.96
治疗性给药	10	131.36 ± 23.29 ¹⁾	142.51 ± 27.52 ¹⁾	96.29 ± 21.47	39.82 ± 13.89
模型	-	158.58 ± 24.33	168.61 ± 18.68	114.98 ± 22.35	48.08 ± 13.59
正常	-	23.30 ± 4.39	-	-	-

注:与同时间点模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ (表2~4同)。表2 抗菌肽 ip 给药对小鼠血清 IL-6 含量的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)ng·L⁻¹

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	4 h	8 h	12 h	24 h
预防性给药	10	81.33 ± 9.28 ¹⁾	103.99 ± 13.40 ¹⁾	86.75 ± 12.90 ¹⁾	60.77 ± 14.91 ¹⁾
治疗性给药	10	93.13 ± 10.67 ¹⁾	108.33 ± 13.68 ¹⁾	95.80 ± 9.98 ¹⁾	72.42 ± 14.20
模型	-	110.43 ± 16.52	130.95 ± 12.81	124.47 ± 16.57	83.43 ± 16.62
正常	-	46.14 ± 8.15	-	-	-

模型组,经统计学检验,实验组 I 各时间点及实验组 II 4 h 小鼠血清 NO 含量与模型组相比差异有显著性($P < 0.05$)。

3.5 对小鼠血清内毒素含量的影响 小鼠感染细

菌后,血清内毒素含量较正常小鼠明显增高($P < 0.05$),抗菌肽预防给药组各时间点上和抗菌肽给药组在 4,12,24 h 内毒素量均低于同时间点模型组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4。

表3 抗菌肽 ip 给药对小鼠血清 NO 含量的影响($\bar{x} \pm s, n=8$) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	4 h	8 h	12 h	24 h
预防性给药	10	55.64 ± 10.28 ¹⁾	78.81 ± 16.74 ¹⁾	56.98 ± 11.25 ¹⁾	45.64 ± 11.96 ¹⁾
治疗性给药	10	73.37 ± 11.13 ¹⁾	103.92 ± 11.11	85.85 ± 16.40	74.34 ± 10.61
模型	-	89.39 ± 15.34	116.99 ± 12.08	95.33 ± 13.80	82.09 ± 12.41
正常	-	24.33 ± 4.28	-	-	-

表4 抗菌肽 ip 给药对小鼠血清内毒素含量的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)ng·L⁻¹

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	4 h	8 h	12 h	24 h
预防性给药	10	19.85 ± 3.77 ¹⁾	24.43 ± 3.84 ¹⁾	20.53 ± 4.83 ¹⁾	16.58 ± 2.76 ¹⁾
治疗性给药	10	22.68 ± 4.15 ¹⁾	28.34 ± 4.18	21.72 ± 3.51 ¹⁾	18.66 ± 3.51 ¹⁾
模型	-	32.29 ± 4.97	34.09 ± 4.76	29.95 ± 3.30	26.39 ± 5.57
正常	-	4.77 ± 0.91	-	-	-

4 讨论

目前,一些感染动物模型及转基因动物实验等研究资料已经明确,某些抗菌肽可通过调节机体的先天免疫反应来增强机体清除病原微生物的能力,并减缓炎症反应引起的组织损伤。如抗菌肽通过与 Toll 样受体结合,抑制 TLR 信号通路,减少促炎细胞因子(如 TNF- α)的产生,从而有效的控制革兰阴性菌感染引起的内毒素休克,防止炎症反应过强而引起的机体损伤^[11]。另外,抗菌肽还能够中和内毒素,减轻脓毒症,在严重细菌感染的情况下,不仅能

够快速杀灭病原微生物,还能迅速停止或限制感染的扩散^[12]。

本实验结果显示,细菌感染后,模型组小鼠腹腔液细菌量从 4 h 的 4 949 CFU· μL^{-1} ,降到 12 h 的 1 594 CFU· μL^{-1} ,说明小鼠依靠自身的免疫力可以消灭一部分细菌。抗菌肽组小鼠的细菌量明显低于模型组,提示抗菌肽在小鼠体内发挥了一定的正向干预作用。课题组前期的实验结果显示,家蝇幼虫分泌型抗菌肽在正常小鼠体内能增强腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的能力,并对小鼠的碳粒廓清指数和

吞噬指数有明显的提高作用(另文报道)。有研究表明,抗菌肽能调节巨噬细胞的活性,促进巨噬细胞非调理素吞噬功能,诱导巨噬细胞信号旁路和 iNOS 合成,激活巨噬细胞清除细菌^[13]。因此,我们推测,抗菌肽在小鼠腹腔内一方面可能有直接的抑菌作用,另一方面,它还通过某些途径激活了腹腔巨噬细胞的吞噬功能,同时促进巨噬细胞产生大量的活性物质,发挥免疫调节作用。但其具体的激活途径,还需要我们进一步的研究才能诠释。预防性给药组小鼠的细菌量少于治疗组,也提示提前给予的抗菌肽在一定程度上提高了机体的免疫力,因而该组小鼠的腹腔液细菌数量较少。

急性腹腔感染时, G⁻产生的内毒素是致病的启动因子,其能激活单核细胞和巨噬细胞,使组织分泌释放促炎反应细胞因子 TNF- α , IL-6, 并诱导 NO 合成酶产生大量 NO。因此,一些研究者常以细胞因子的基因表达及分泌量作为观察某些因素作用效应的指标。本实验中,小鼠腹腔注射大肠埃希菌造成急性感染后,血清 TNF- α , IL-6, NO 和内毒素水平均明显升高。经抗菌肽干预后,抗菌肽组尤其是预防性给药组各参数水平均较模型组明显降低。从实验结果上看,腹腔液细菌数量越少组,其小鼠血清 TNF- α , IL-6 及 NO 含量也越低,细菌数量与这几种炎症因子含量间有一定的正相关性。这个结果也进一步证实我们的推断:抗菌肽在腹腔内通过各种途径使腹腔细菌量降低后,细菌释放的内毒素减少,也可能是抗菌肽具有直接的中和内毒素的作用而使内毒素的含量降低,这在一定程度上阻断了 G⁻菌致病的始动因素,从而抑制炎症因子的分泌。但抗菌肽在体内的具体作用机制还需进一步的研究。

[参考文献]

[1] Oyston P C, Fox M A, Richards S J, et al. Novel peptide therapeutics for treatment of infections [J]. J Med Microbiol, 2009, 58(8) : 977.

[2] Coffelt S B, Scandurro A B. Tumors sound the alarmin (s) [J]. Cancer Res, 2008, 68(16) : 6482.

[3] Kim Y C, Ludovice P J, Prausintz M R. Transdennai delivery haneed by magainin pore-forming peptide [J]. Controlled Release, 2007, 122(3) : 375.

[4] 方超, 张晓巩, 周颖, 等. 抗菌肽开发与应用的研究进展 [J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(11) : 809.

[5] 常楚瑞, 吴建伟, 国果, 等. 家蝇幼虫乙醇提取物的抗炎镇痛作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13) : 113.

[6] Ping Fu, Jianwei Wu, Guo Guo. Purification and Molecular Identification of an Antifungal Peptide from the Hemolymph of *Musca domestica* (housefly) [J]. Cell Mol Immunol, 2009, 6(4) : 245.

[7] 张文吉, 明九雪, 罗纪台. 家蝇幼虫分泌物防治植物病害研究简报 [J]. 植物保护学报, 1994, 21(1) : 90.

[8] 国果, 吴建伟, 付萍, 等. 家蝇幼虫分泌型抗菌肽的纯化及生物学特性研究 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志. 2007, 25(2) : 87.

[9] 国果, 吴建伟, 付萍, 等. 家蝇幼虫分泌物抗菌肽对小鼠血清溶菌酶含量的影响 [J]. 贵阳医学院学报, 2007, 32(6) : 586.

[10] 国果, 吴建伟, 张亚莉. 家蝇抗菌肽对细菌感染小鼠外周血多项指标的影响 [J]. 热带医学杂志, 2010, 10(8) : 921.

[11] Mookherjee N, Brown K L, Bowdish D M, et al. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37 [J]. J Immunol, 2006, 176(4) : 2455.

[12] Mookherjee N, Hancock R E. Cationic host defence peptides; innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections [J]. Cell Mol Life Sci, 2007, 64(7/8) : 922.

[13] Hancock Rew. Cationic antimicrobial peptides; towards clinical applications [J]. Expert Opin Invest Dis, 2000, 9: 1723.

[责任编辑 聂淑琴]