

黑眶蟾蜍 Cathelicidin-DM 抗菌肽功能研究

张康,王桂喜,张金阳,韩芹芹,夏雪山,宋玉竹*

昆明理工大学生命科学与技术学院,昆明 650500

摘要: Cathelicidin-DM 的广谱抑菌活性已被证明,该研究拟探索它的其他生物学活性,从而更加全面的了解 Cathelicidin-DM。通过固相合成 Cathelicidin-DM,对其进行抗氧化活性检测、溶血活性检测、凝集素活性检测和细胞毒性检测、肿瘤细胞毒性检测。结果表明 Cathelicidin-DM 对于 ABTS⁺ 自由基清除活性很强,但对于 DPPH 自由基的清除活性相对较弱,具有一定的抗氧化活性,对小鼠巨噬细胞系 RAW 264.7 具有一定的细胞毒性,溶血活性、凝集活性、肿瘤细胞毒性均不明显。Cathelicidin-DM 不仅具有广谱抑菌活性,而且具有抗氧化活性,或可作为生物类抗氧化剂使用。

关键词: 黑眶蟾蜍; cathelicidin-DM; 抗氧化活性; 溶血活性; 细胞毒性

中图分类号: R285.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022) Suppl-0104-05

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.S.016

Study on the function of cathelicidin-DM in *Duttaphrynus melanostictus*

ZHANG Kang, WANG Gui-xi, ZHANG Jin-yang, HAN Qin-qin, XIA Xue-shan, SONG Yu-zhu*

Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China

Abstract: The broad-spectrum antibacterial activity of cathelicidin-DM has been proven, and this study intends to explore its other biological activities to further promote its clinical application. cathelicidin-DM was synthesized by solid-phase synthesis, and the antioxidant activity, hemolytic activity, lectin activity, cytotoxicity and tumor cytotoxicity were detected. The results show that cathelicidin-DM has strong scavenging activity for ABTS⁺ free radicals, but relatively weak scavenging activity for DPPH free radicals, and has certain cytotoxicity to the RAW 264.7. Hemolytic activity, lectin activity, and tumor cell toxicity are not obvious. cathelicidin-DM not only has broad-spectrum antibacterial activity, but also has antioxidant activity. Solving its cytotoxicity will be a major pre-clinical challenge. Or it can be used as a biological antioxidant.

Key words: *Duttaphrynus melanostictus*; cathelicidin-DM; antioxidant activity; hemolytic activity; cytotoxicity

黑眶蟾蜍 (*Duttaphrynus melanostictus*), 在我国分布极广, 有着非常强的环境适应能力, 是我国药典规定的蟾蜍类药材的主要来源之一。蟾蜍类药材主要包括蟾酥、干蟾、蟾皮和蟾衣, 分别是蟾蜍科动物的耳后腺或者皮肤腺分泌物、干燥全体、表皮及自然蜕下的角质衣膜。现代药理学研究表明其具有强心、抗肿瘤、局麻、镇痛、抗炎等多种作用^[1]。抗菌肽是在外界条件刺激下, 动物免疫防御系统产生的一类对外源病原体的致病作用具有免疫活性的多肽物质, 是动物非特异性免疫防御的重要组成部分^[2]。两栖动物的皮肤裸露潮湿蕴含着丰富的抗

菌肽, 已在二百多种两栖动物中发现 3 000 多种抗菌肽。但多数研究集中于蛙类, 作为中药来源的蟾蜍类因其生存的环境更加远离水源, 皮肤更加干燥, 相比之下不易产生抗菌肽而研究较少。本试验研究黑眶蟾蜍皮肤中的抗菌肽活性, 从而对此方面研究进行丰富。Cathelicidin-DM 是从黑眶蟾蜍皮肤 (蟾皮) cDNA 文库中克隆得到的 cathelicidins 家族抗菌肽。Cathelicidins 不仅对许多革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌和病毒具有非常强的活性, 而且对许多临床耐药微生物同样具有作用^[3,4]。除此之外, Cathelicidins 还具有许多其他的生物学活性, 如细胞趋化、促进伤口愈合、抑制组织损伤、诱导血管生成和淋巴细胞活化等^[3,5-8]。我们利用固相合成的方法合成了 Cathelicidin-DM, 并对其可能具有的各种生物学活性进行了初步研究。使我们能够更加全面

收稿日期: 2021-01-18 接受日期: 2021-05-11

基金项目: 国家自然科学基金 (3186130375)

* 通信作者 Tel: 86-871-65939528; E-mail: syzzam@126.com

的了解 Cathelicidin-DM 抗菌肽的性质,为 Cathelicidin-DM 的临床合理应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 Cathelicidin-DM 的合成

用于功能研究的 Cathelicidin-DM (SSRRKPKK-GWLCKLKLRRGGYTLIGSATNLNRPTYVRA) 由丹港生物科技公司合成,小肽纯度 > 95%。保存于-20 °C

1.2 试剂

ABTS(2,2'-连氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐,美国 Amresco); DPPH(2,2'-二苯代苦味酰基苯肼,美国 Sigma); PBS 缓冲液(137 mmol/L NaCl、2.7 mmol/L KCl、10 mmol/L NaH₂PO₄、2 mmol/L KH₂PO₄,调 pH 至 7.4,高压灭菌后室温保存);阿氏液(30 mmol/L 柠檬酸钠、30 mmol/L 柠檬酸、110 mmol/L 葡萄糖、70 mmol/L NaCl,调 pH 至 6.1,高压灭菌后 4 °C 保存);TBS-buffer(50 mmol/L Tris、100 mmol/L NaCl); TBS + Ca²⁺-buffer (50 mmol/L Tris、100 mmol/L NaCl、10 mmol/L CaCl₂); CCK-8 溶液、Triton X-100、RPMI1640 培养基和 DMEM 培养基;过硫酸钾、甲醇、NaCl、NaH₂PO₄、KH₂PO₄ 等试剂均为实验室分析纯。

2 实验方法

2.1 抗氧化活性检测

2.1.1 ABTS⁺ 自由基清除活性

称取 ABTS 溶于 PBS 缓冲液中,配制成浓度为 2 mmol/L ABTS 储存液。

向 ABTS 储存液中加入 70 mmol/L 过硫酸钾水溶液并混匀,使其最终质量比为 3:1,于室温避光反应 12~16 h,使其成为 ABTS⁺ 溶液。试验开始前,用 PBS 缓冲液将 ABTS⁺ 溶液稀释至 734 nm 波长处的吸光值为 1.0 左右。

将 2 μL 不同浓度的样品分别加入 48 μL 经过校正的 ABTS⁺ 溶液并混匀,溶解介质作为空白对照,室温反应 10 min,于 734 nm 波长处检测各样品的吸光值。ABTS⁺ 清除率计算公式如下:

$$\text{ABTS}^+ \text{清除率} = [(A_B - A_A)/A_B] \times 100\%$$

式中,A_B:空白对照的吸光值;A_A:样品的吸光值。

2.1.2 DPPH 自由基清除活性

配制 0.6 mmol/L 的 DPPH 甲醇溶液,取不同浓度样品 2 μL 加入到 48 μL DPPH 溶液中混匀,溶解介质作为空白对照,室温避光静置 30 min。使用甲

醇进行调零,于 517 nm 处检测吸光值。DPPH 清除率计算公式如下:

$$\text{DPPH 清除率} = [(A_B - A_A)/A_B] \times 100\%$$

式中,A_B:空白对照的吸光值;A_A:样品的吸光值。

2.2 溶血活性测定

小鼠眼球取血,将小鼠血与阿氏液 1:1 混匀置于离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,用生理盐水洗涤至上清透明。将洗涤好的红细胞用生理盐水稀释成 10⁷~10⁸ 悬浮液。稀释好的红细胞与溶解于生理盐水的不同浓度的样品 37 °C 保持 30 min,于 540 nm 测吸收值。阳性对照使用 Triton X-100,阴性对照使用生理盐水。

2.3 凝集素活性检测

小鼠眼球取血,将小鼠血与阿氏液 1:1 混匀置于离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,分别用 TBS-buffer 和 TBS + Ca²⁺-buffer 洗涤血细胞,直至上清不再红色为止。将洗涤好的血细胞分别用 TBS-buffer 和 TBS + Ca²⁺-buffer 稀释至一定浓度。然后加入不同浓度的样品混匀,溶解介质作为阴性对照,室温静置 30 min 左右。观察结果。

2.4 细胞毒性检测

CCK-8 法是用于测定细胞增殖或毒性试验中活细胞数目的一种高灵敏度、无放射性的比色检测法,主要试剂 WST-8 被细胞内脱氢酶氧化还原后生成的橙黄色甲臞染料能够溶解在组织培养基中,生成的甲臞量与活细胞数量呈正比^[9]。本试验使用 CCK-8 法检测样品对小鼠巨噬细胞系 RAW 264.7 细胞毒性。

将巨噬细胞于 RPMI1640 培养基中培养,待细胞长满后,用 0.25% 的胰蛋白酶消化下来,并用培养基悬浮细胞。计数后将 180 μL 细胞悬液加入到 96 孔细胞培养板中,使每孔细胞数达到 10⁵ 个。加入不同浓度样品,对照组使用溶解介质并用培养基作为调零孔。置于 37 °C,5% CO₂ 培养箱培养 24 h。培养结束后,再向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,继续培养 4 h,使用酶标仪于 450 nm 处测定吸光值。

2.5 肿瘤细胞毒性检测

用 CCK-8 法检测样品对肝癌细胞系 HepG2 的肿瘤细胞毒性,于 DMEM 培养基中培养,具体方法如上。

3 结果

3.1 抗氧化活性

我们检测了 Cathelicidin-DM 对 ABTS⁺ 自由基和 DPPH 自由基的清除活性。对 ABTS⁺ 自由基和 DPPH 自由基清除活性结果如图 1 和图 2 所示,结果表明在样品浓度为 100 μg/mL 时, Cathelicidin-DM 对 ABTS⁺ 自由基的清除率为 47.6%, 对 DPPH 自由基的清除率为 4.61%。而当浓度提高到 300 μg/mL 时对 ABTS⁺ 自由基的清除率也相应的提高到了 69.6%, 对 DPPH 自由基的清除率提高到了 37.5%。说明随着浓度的增加 Cathelicidin-DM 清除自由基的能力也得到了提高,我们同时采用这两种试验方法,结果证明 Cathelicidin-DM 对于 ABTS⁺ 自由基清除活性很强,但对于 DPPH 自由基的清除活性相对较弱,具有一定的抗氧化活性,因此可作为潜在的自由基清除剂和抗氧化剂。

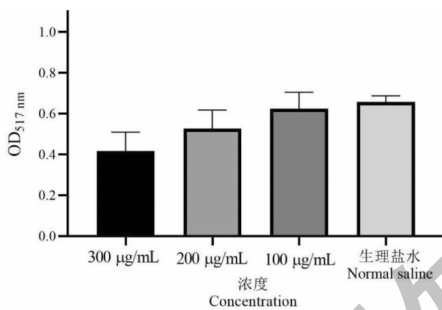


图 1 ABTS⁺ 自由基清除活性

Fig. 1 ABTS⁺ radical scavenging activity

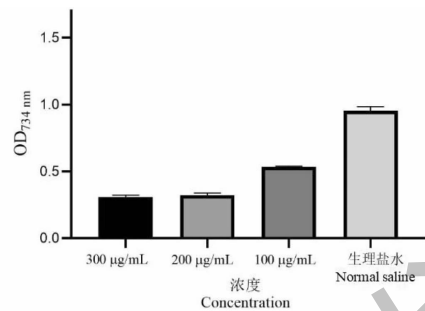


图 2 DPPH 自由基清除活性

Fig. 2 DPPH radical scavenging activity

3.2 溶血活性和凝集活性

Cathelicidin-DM 对小鼠红细胞的溶血活性如表 1 所示。结果表明,在 Cathelicidin-DM 浓度高达 300 μg/mL 时,对小鼠红细胞也未表现出溶血活性。这表明 Cathelicidin-DM 基本不具有溶血活性,这就为它的药物开发奠定了基础。

我们检测了 Cathelicidin-DM 对小鼠红细胞的凝集活性。结果表明,无论在有无 Ca²⁺ 存在的条件下, Cathelicidin-DM 对小鼠红细胞均无凝集活性。

3.3 细胞毒性和抗肿瘤活性

用 CCK-8 的方法检测了样品对小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 和肝癌细胞系 HepG2 的毒性作用(如表 1 所示)。结果表明在 Cathelicidin-DM 浓度达到 100 μg/mL 时,对 RAW 264.7 的抑制率为 66.5%, 对 HepG2 无明显的抑制效果。这表明 Cathelicidin-DM 有一定的细胞毒性但无抗肿瘤活性。

表 1 Cathelicidin-DM 的生物活性

Table 1 Bioactivities of cathelicidin-DM

抗氧化活性 Antioxidant activity (%) ^a		溶血活性 Hemolytic activity ^a	凝集素活性 Lectin activity ^a	细胞毒性 Cytotoxicity ^b (%)	抗肿瘤活性 Anti-tumor activity ^b
ABTS ⁺	DPPH				
69.6	37.5	ND	ND	66.5	ND

注: a: Cathelicidin-DM 的浓度为 300 μg/mL; b: Cathelicidin-DM 的浓度为 100 μg/mL。实验结果为三次独立实验(三个重复)的平均值。ND: 未检测到活性。

Note: ^aConcentration of cathelicidin-DM is 300 μg/mL; ^bConcentration of cathelicidin-DM is 100 μg/mL. The results in this table represent mean values of three independent experiments performed in duplicates. ND: No activity detected.

4 讨论与结论

自由基 (free radical) 是指含有奇数电子的分子、原子或离子,它是体内正常代谢过程中的副产物,是代谢活动必定会产生的物质。在生物体内的自由基主要是活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS)。活性氧是指由氧产生,含有氧并且性质活泼的原子或者原子团,包括羟自由基、脂氧自由

基、超氧阴离子自由基、一氧化氮和二氧化氮自由基、过氧化氢等^[10,11]。研究表明在生物体内的活性氧自由基具有某些生理功能,参与免疫调控和信号传导等生物过程。自由基最主要的特点是活泼性,极不稳定,氧化能力极强,过量的自由基积累就会对体内的蛋白质、细胞膜,甚至 DNA 都会造成严重的损害,从而导致疾病的发生^[12]。截至目前,已经发

现多种疾病与自由基相关,如肿瘤^[13]、心脏病^[14]、老年痴呆^[15]、糖尿病^[16]、帕金森病^[17]、血管粥样硬化等^[18]。为了对抗各种来源的自由基,生物体形成了一系列防御机制,其中抗氧化剂的产生和摄入占有十分重要的地位^[11]。ABTS 和 DPPH 法是检测抗氧化活性的常用方法,它们的原理分别是:ABTS 可被氧化生成稳定的阳离子自由基 $ABTS^+$,呈蓝绿色,在 734 nm 处有最大吸收峰,在有抗氧化剂的存在下, $ABTS^+$ 可以与之反应,生成没有颜色的 ABTS,测定 734 nm 处的吸光值变化可以反映抗氧化剂清除 $ABTS^+$ 的能力大小;DPPH 自由基是一种人工合成的、稳定的有机自由基,其甲醇或乙醇溶液呈深紫红色^[19]。并在 517 nm 附近有强吸收,当有抗氧化剂存在时,在 517 nm 处的吸光值会变小。颜色会由深紫色变成浅黄色。其吸光值变小的程度与清除自由基的能力呈正相关性,因此可以用来检测抗氧化活性。在本研究中分别用这两种方法对 Cathelicidin-DM 的抗氧化活性进行检测,结果显示出了较大的差异性。这极有可能是由他们的溶剂差异产生,与 ABTS 法相比,DPPH 法只能溶于有机溶剂,Cathelicidin-DM 在有机溶剂中的溶解度低于水溶液,可能是导致 ABTS 法测得的抗氧化活性远高于 DPPH 法测得活性的原因,或许也跟 ABTS 法产生的自由基并非生理条件下存在的自由基有关。

Cathelicidins 是一类功能多样的抗菌肽。它除了具有抗菌的能力外,还与伤口修复、趋化功能(导致炎症的细胞聚集到病灶部位)、防腐功能、与 LPS 互相作用之后导致细胞溶解和诱导血管生成有关。已有研究表明 Cathelicidin-DM 具有广谱的抗微生物活性,对革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌(特别是一些临床分离的耐药菌株)^[20] 和真菌均有活性。在本研究中,我们对 Cathelicidin-DM 的抗氧化活性、溶血活性、凝集素活性、细胞毒性和肿瘤细胞活性进行了检测。结果表明 Cathelicidin-DM 的溶血活性、凝集素活性、肿瘤细胞毒性均不明显。但是 Cathelicidin-DM 具有较强的抗氧化活性和一定的细胞毒性。这使我们对 Cathelicidin-DM 有了更加全面的了解。

溶血性和细胞毒性一直是抗菌肽应用中的重要限制因素。研究表明 Cathelicidins 家族的抗菌肽溶血性和细胞毒性一般较低。如:Cathelicidin-AL 对人脐静脉内皮细胞系(HUVEC)以及小鼠巨噬细胞系(RMMCs)均无细胞毒性^[21];Cathelicidin-BF 对

红细胞轻微溶血,浓度为 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对人的肝癌细胞系(HepG2)和小鼠的巨噬细胞系(RAW 264.7)均没有毒性^[22];Cathelicidin-RC1 在浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对肝癌细胞系(HepG2),人前列腺癌细胞系(PC3)和小鼠成纤维细胞系(L929)有轻微毒性,死亡率分别为 4.3%、2.5% 和 1.1%^[23];Cathelicidin-PY 在浓度为 12.5、25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时引起人红细胞 2.5%、3.5%、5.5% 溶血,浓度高于 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对小鼠巨噬细胞系(RAW 264.7)有毒性,浓度为 50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RAW 264.7 死亡率为 2.7%、3.3%、5.1%^[24]。但也有例外,环颈雉 CATH-1 与 CATH-2 在 10~20 μM 时,可杀死 50% 小猎犬肾上皮细胞(MDCK)和小鼠巨噬细胞 RAW 264.7。在本研究中 Cathelicidin-DM 对小鼠巨噬细胞系 RAW 264.7 也具有较高的细胞毒性。解决它的细胞毒性将是作为抗生素类药物临床应用前的一大问题。但它的抗氧化活性提示我们,或可作为生物抗氧化剂来进行开发使用。

参考文献

- 1 Chen ZJ. Preclinical Study of cathelicidin-DM from *Duttaphrynus melanostictus* [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology(昆明理工大学),2016.
- 2 Yang XM, Jiang LY, Jiang HS. Antibacterial peptides in aquatic animals and its gene engineering research [J]. Lett Biotechnol (生物技术通讯),2006,17(1):109-111.
- 3 Zanetti M, Gennaro R, Scocchi M, et al. Structure and biology of cathelicidins [J]. Adv Exp Med Biol,2000,479:203-218.
- 4 Gallo RL, Kim KJ, Bernfield M, et al. Identification of CRAMP, a cathelin-related antimicrobial peptide expressed in the embryonic and adult mouse [J]. Biol Chem,1997,272:13088-13093.
- 5 Shi Y, Li C, Wang M, et al. Cathelicidin-DM is an antimicrobial peptide from *Duttaphrynus melanostictus* and has wound-healing therapeutic potential [J]. ACS Omega,2020,5:9301-9310.
- 6 Gennaro R, Zanetti M. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides [J]. Biopolymers,2000,55(1):31-49.
- 7 Zaiou M, Gallo RL. Cathelicidins, essential gene-encoded mammalian antibiotics [J]. Mol Med (Berl),2002,80:549-561.
- 8 Ramanathan B, Davis EG, Ross CR, et al. Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity [J]. Microbes Infect,2002,4:361-372.

- 9 Liu ZS, Cao XM, Xu LJ, et al. Study on the best conditions for detecting chicken lymphocyte activity with CCK8 method [J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med (黑龙江畜牧兽医), 2017(13):212-214.
- 10 Puzanowska-Tarasiewicz H, Kuzmicka L, Tarasiewicz M. Reactive nitrogen and oxygen species [J]. Pol Merkur Lekarski, 2009, 27(160):338-340.
- 11 Jacob RA, Burri BJ. Oxidative damage and defense [J]. Am J Clin Nutr, 1996, 63(6):985S-990S.
- 12 Pourouva J, Kottova M, Voprsalova M, et al. Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes [J]. Acta Physiol (Oxf), 2010, 198(1):15-35.
- 13 Oyagbemi AA, Azeez OI, Saba AB. Interactions between reactive oxygen species and cancer: the roles of natural dietary antioxidants and their molecular mechanisms of action [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2009, 10:535-544.
- 14 Misra MK, Sarwat M, Bhakuni P, et al. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes [J]. Med Sci Monit, 2009, 15(10):RA209-219.
- 15 Shi Q, Gibson GE. Oxidative stress and transcriptional regulation in Alzheimer disease [J]. Alzheimer Dis Assoc Disord, 2007, 21:276-291.
- 16 Hakim FA, Pflueger A. Role of oxidative stress in diabetic kidney disease [J]. Med Sci Monit, 2010, 16(2):RA37-48.
- 17 Foley P, Riederer P. Influence of neurotoxins and oxidative stress on the onset and progression of Parkinson's disease [J]. Neurol, 2000, 247(Suppl 2):II82-94.
- 18 Yang H, Wang X, Liu X, et al. Antioxidant peptidomics reveals novel skin antioxidant system [J]. Mol Cell Proteomics, 2009, 8:571-583.
- 19 Wei XY, Yin LQ, Zhong C, et al. Research progress on the evaluation of antioxidant activity by DPPH method [J]. Food Sci(食品科学), 2014, 35:317-322.
- 20 Wang M. Gene cloning, expression, structure and functional cathelicidin-DM from *Duttaphrynus melanostictus* [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology (昆明理工大学), 2015.
- 21 Hao X, Yang H, Wei L, et al. Amphibian cathelicidin fills the evolutionary gap of cathelicidin in vertebrate [J]. Amino Acids, 2012, 43:677-685.
- 22 Wang Y, Hong J, Liu X, et al. Snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotics [J]. PLoS One, 2008, 3(9):e3217.
- 23 Ling G, Gao J, Zhang S, et al. Cathelicidins from the bullfrog *Rana catesbeiana* provides novel template for peptide antibiotic design [J]. PLoS One, 2014, 9(3):e93216.
- 24 Wei L, Yang J, He X, et al. Structure and function of a potent lipopolysaccharide-binding antimicrobial and anti-inflammatory peptide [J]. Med Chem, 2013, 56:3546-3556.

(上接第 67 页)

- 11 Fan TC, Dou ZY, Li J, et al. Effects of different drying methods on chemical components of traditional Chinese medicine: a review [J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2021, 23:2017-2024.
- 12 Zheng DM, Han HL, Zhou YF, et al. Determination of 8 active components in volatile oil of *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai with different drying methods by GC [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2019, 30:2895-2898.
- 13 Yang MT, Wang X, Wang Q, et al. Effects of different drying methods on the main components of *Forsythia suspensa* flowers [J]. China Pharm(中国药房), 2021, 32:921-926.
- 14 Zhao LX, Li RQ, Zhao JQ. Effects of different drying methods on main components of *Ranae Oviductus* [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2017, 28:1647-1648.
- 15 Liu M, Shi ZJ, Yang Z. Effects of different thermal processing temperatures on fatty acid composition and fat oxidation of beef jerky [J]. Meat Res(肉类研究), 2019, 33(2):1-6.