

# 贻贝防卫素的研究进展\*

## Progress of Research on Mussel Defensins

陈皓文 魏玉西\*\* 郭道森\*\*

Chen Haowen Wei Yuxi Guo Daosen

(国家海洋局第一海洋研究所 山东青岛 266061)

(First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao, Shandong, 266061, China)

**摘要** 防卫素是贻贝等海洋软体动物的重要抗微生物肽,迄今发现的贻贝防卫素根据其初级结构、性质和共有的半胱氨酸列阵分成:贻贝防卫素(MDA和MDB)、地中海贻贝防卫素(MGD1和MGD2)、Myticins(Myticin A和Myticin B)、Mytilins(Mytilin A, Mytilin B, Mytilin C, Mytilin D和Mytilin G1)和Mytimycin。阐述它们的化学性质、结构、产生和生物活性等。不同环境中的贻贝不易为重病所折磨,能抵御各类微生物的入侵和保卫自身,对贻贝防卫素的研究有助于人们理解贻贝及其他海洋软体动物的先天免疫并提高海水养殖的水平。

**关键词** 贻贝 防卫素 抗微生物肽 先天免疫 海洋软体动物

中图分类号 Q959.210.6;S944.42

**Abstract** Defensins contained in mussel and other marine mollusca are important antimicrobial peptides. The mussel defensins known update are divided into four groups according to character, primary structure and mutual cysteine sequence. They are mytilus defensins(MDA and MDB), Mytilus galloprovincialis defensins(MGD1 and MGD2); Myticins A and B; Mytilins A, B, C, D, G1; and Mytimycin. Their chemical character and structure, production and bioactivities are explained. The mussels living in various environments are not subjected to serious diseases, and resist invading of diverse pathogens and protect themselves from enemy microbials. The researches on mussel defensins are contribute to understand of the innate immunity of mussel and other marine mollusca, and improvement of maricultural techniques.

**Key words** mussel, defensin, antimicrobial peptide, innate immunity, marine mollusca

贻贝属于贻贝目贻贝科贻贝属(*Mytilus*)。在我国贻贝约有30余种,经济价值较高者有10余种,其中的食用贻贝(*M. edulis*)、翡翠贻贝和厚壳贻贝为我国主要养殖种。包括贻贝在内的软体动物的许多种类具有重要的经济价值,但其对抗微生物时惊人的防卫活性却被忽视了,直至1996年仍未见报道。实际上,软体动物明显地对一些微生物病原敏感。它们依赖血细胞或淋巴细胞样细胞对入侵微生物作细胞防卫反应。近年来的研究已发现抗微生物肽是软体动物在漫长进化历程中保存下来的天然免疫作用之一。软体动物抗微生物肽具备一种崭新的无脊椎动物活性作用模式,与哺乳动物抗微生物肽密切相关,如贻贝血细胞与人单核细胞/巨噬细胞系统相似,但又经与昆虫抗微生物肽结构相关的分子中介,显出与节肢动物防卫素有共同的祖先(起源)。贻贝防卫素等抗微生物肽主要与其血细胞进行生产、贮存、分泌、转运和抗杀

菌等活动,并在循环细胞中丰富。贻贝等双壳类软体动物的血细胞浓度为 $(2\sim 4)\times 10^6$ 细胞/毫升。其中的粒细胞是防卫素进行免疫反应的主要细胞效应物,经循环细胞运行全身。防卫素等抗微生物肽可在身体许多部位及器官,包括在体表中表达并形成防病原入侵和保护自身的第一道防线。

目前发现的防卫素大多是一类小分子量、阳离子、富半胱氨酸 $\alpha$ -螺旋的、具抗特定微生物活性的肽。已被阐明的贻贝防卫素根据其初级结构中固有的半胱氨酸序列,分为4类:(1)贻贝防卫素(MDA和MDB)和地中海贻贝防卫素(MGD1和MGD2);(2)Myticins(Myticin A, Myticin B);(3)Mytilins;(4)Mytimycin。

本文旨在论述贻贝类的防卫素化学性质、结构、产生和生物学功能等,以利于加深对贝类动物防御病害机制的认识和理解。

### 1 贻贝防卫素和地中海贻贝防卫素

#### 1.1 贻贝防卫素(MDs)

分离自食用贻贝(*M. edulis*)血浆的防卫素,一

2002-06-07收稿,2003-01-20修回。

\* 国家自然科学基金项目资助(编号:40086001)。

\*\* 青岛大学 山东青岛 266003(Qingdao Univ., Qingdao, Shandong, 266003, China)

广西科学 2003年5月 第10卷第2期

个被命名为贻贝防卫素 A (*Mytilus defensin A*, 缩写为 MDA), 另一个被命名为贻贝防卫素 B (*Mytilus defensin B*, 缩写为 MDB)。MDA 的分子量为 4314.3Da, 含 37 个氨基酸残基, 其中包括 6 个半胱氨酸残基 (Cys-), 构成 3 个分子内二硫键。其 2 位和 28 位上未获得乙内酰苯硫脲氨基酸, 可能被修饰或携带一个基团取代 (或保守性置换)。MDB 的分子量为 4392.4Da, 有 35 个氨基酸残基, 也含 6 个半胱氨酸残基。其 28 位上无信号。在其 COOH 端可能有少数几个额外的残基, 与 MDA 类似。

已测定出的 MDA 和 MDB 的氨基酸序列如下 (C 为 2 个防卫素共有的半胱氨酸列阵)。

MDA GFG C PNDYP C HRHC KSIPGRXGGY C  
MDB GFG C PNDYP C HRHC KSIPGRXGGY C  
GGXHRLR C T C YR  
GGXHRLR C T C

分析显示 MDAs 与蜉 ( *Aeschna cyanea* ) 和蝎 ( *Leiurus quinquestriatus* ) 的防卫素的序列有 70% 一致, 进化上同源。上述三防卫素排成一列, 与伏蝇防卫素相对。MDA 的三级结构在 NH<sub>2</sub>- 端已导出一个间隙, 相应于伏蝇防卫素扩展的环。MDAs 的 NH<sub>2</sub>- 端短于伏蝇防卫素的。MDB 和 MDA 的序列靠得很近, 都显出半胱氨酸位置高度保守, 与节肢动物防卫素类似。表明这些贻贝肽与节肢动物防卫素有真正的进化同源性, 防卫素序列分部的系统发育分析又揭示出它们属于缓慢进化组的代表, 相应于优势组成性表达的防卫素。

MDA 和 MDB 存在于含大颗粒的粒细胞的大颗粒及含小颗粒的粒细胞中, 或与 Mytilins 一起, 部分地分布于相同血细胞亚群。消化道表皮及肠道细胞的颗粒结构中, 也在细胞浸润的消化道表皮中表达。该防卫素的基因以一个单拷贝存在于基因组中, 其信使浓度在循环血细胞中不增加。MDA 和 MDB 主抗 G 细菌, 包括一些海洋无脊椎动物的病原, 详见表 1。

## 2.2 地中海贻贝防卫素 (MGDs)

地中海贻贝防卫素是分离自地中海贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*) 血浆和血细胞的防卫素或防卫素样肽, 即 *Mytilus galloprovincialis defensin* 或 defensin-like peptides, 缩写为 MGDs, 它分为 MGD1 和 MGD2。

MGDs 是节肢动物防卫素家族的一个原始新成员。MGD1 分子量为 4 kD, 最初由 Hubert 等<sup>[1]</sup>在 1996 年发现自地中海贻贝的酸性无细胞血淋巴上清液, 后来从血细胞中的富细胞器的片段中也分离得到。由 RF-PCR (反转录转座聚合酶链反应) 获得由可译框

架 ORF 末端和 3' 未翻译区组成的 MGD1 的 cDNA 片段, 表示 MGD1 与节肢动物防卫素的分子有类似性。MGD1 分子中除 6 个半胱氨酸外还有另外 2 个半胱氨酸和 1 个修饰了的氨基酸。MGD1 具有规范的似节肢动物防卫素的 C $\beta$  (Cysteine-Stabilized  $\alpha$ - $\beta$  motif) 结构, 主要包括 1 个螺旋部分 (Asn7- Ser16) 和 2 个逆平行的  $\beta$ -链 (Arg20- Cys25 和 Cys33- Arg37), 一起形成蝎毒中常见的由 4 个二硫键稳定的  $\alpha$ - $\beta$  模板。除 Cys21- Cys38 二硫键是溶剂暴露的之外, 其他 3 个二硫键均为高度束缚的特别疏水的芯。在 Cis 结构中的 C $\alpha$ - P 酰胺键特化出 MGD1 结构。

MGD1 含 39 个氨基酸残基。第 39 位上有甘氨酸残基, C- 端酰胺化。

MGD1 对人的红细胞和原生动植物无细胞毒性。抗微生物活性如表 1 所示。此生物学活性由分子中 3 个二硫键产生, Trp28 的羟化作用不包含在生物学活性之中, 即 Cys21- Cys38 键对于此活性不是本质的。整个分子结构中显示出位于 3 个疏水簇中的典型阳电荷分布和疏水侧链, 它们保证产生杀细菌效能及对 G 细菌的专一性。现已能人工合成出 MGD1, 其抗细菌活性类似天然 MGD1。

MGD1 存在于血细胞的富含细胞器的片段中。经细菌诱导的贻贝, 触发血浆中 MGD1 的浓度在 24 h 后增加。血淋巴在被注射即时或之后, MGD1 免疫反应向胞膜迁移, 并释放 MGD1 进入循环系统作全身性的抗微生物感应。循环血细胞中 MGD1 信使浓度不在细胞被诱导后立即增加, 而是在 48 h 后戏剧性地增加。MGD1 的天然形式纯化自血细胞, 说明是在血细胞中从前体加工成 MGD1 活性化合物的。MGD1 前体含 39 个氨基酸残基的成熟肽及 1 个额外的阴离子的 H 残基的 C- 端序列。而成熟肽可通过常规加工机制产生, 并循环酰胺化作用信号“G- R- R”。MGD1 的成熟经下列 3 个步骤完成: (1) 经识别该大前体的二元序列 (R-R) 的加工酶在 41 位和 42 位的 R 和 D 间作剪切; (2) 一个羧肽酶  $\alpha$ - 样的酶释放 R-40 和 R-41; (3) 对前体的羧基端 G 残基识别的酶催化氧化的酰胺化作用<sup>[1-3]</sup>。

MGD2 最初分离自地中海贻贝, 后来在食用贻贝中也测到 MGD2 的 mRNA。MGD2 分子含 39 个氨基酸残基及 8 个 Cys-, 与 MGD1 的氨基酸序列相比, 有 6 个不同的氨基酸残基。MGD2 的 cDNA 序列有 1 个具 2 碱基的 N- 端原序列, 含有 1 个信号序列的疏水芯特征。细菌注入触发转录物, 使 MGD2 在 6 h 和 24 h 后的浓度减少, 但与 Mytilin B 相反, MGD2 的 mRNA 水平直至采样期结束仍保持低下 (这是受细菌攻击

表 1 贻贝防卫素的抗微生物活性

Table 1 Antimicrobial activities of mussel defensins

贻贝防卫素种类 Mussel defensins	对抗微生物的状况 Antimicrobial conditions	备注 Remarks
M GD1	抗 G <sup>-</sup> 细菌: 藤黄微球菌、大肠埃希氏菌、解藻肌酸弧菌、副溶血弧菌、灿烂弧菌; 也抗一些 G <sup>-</sup> 细菌, 合成的 M GD-抗细菌活性类似天然 M GD1 Anti-G <sup>-</sup> bacteria <i>M. luteus</i> , <i>E. coli</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. splendidus</i> , and anti-some of G <sup>-</sup> bacteria. Manmade M GD-1 is similar to natural MGD-1 in antibacterial activity.	人 O 型血球 20% 溶解 Dissolution of 20% O-type blood cells of human
Myticins		
A	明显对抗 G <sup>-</sup> 细菌: 藤黄微球菌、巨大芽孢杆菌、绿色气球菌。 Anti-G <sup>-</sup> bacteria markedly: <i>M. luteus</i> , <i>B. megatherium</i> , <i>A. viridans</i> .	
B	抗上述三菌力比 A 更强, 还抗大肠埃希氏菌、尖孢镰刀菌。 It is more powerful in anti three species of bacteria mentioned above, and also anti- <i>gonize E. coli</i> , <i>F. oxysporum</i> .	
Mytilins	总体看对抗 G <sup>-</sup> 细菌的活性强于抗 G <sup>+</sup> 细菌。 It is more powerful in anti-G <sup>-</sup> bacteria than in anti-G <sup>+</sup> bacteria overall.	
A	抗 G <sup>-</sup> 细菌: 藤黄微球菌、大肠埃希氏菌, 抗 G <sup>+</sup> 细菌稍弱。 Anti-G <sup>-</sup> bacteria <i>M. luteus</i> , <i>E. coli</i> , weaker in anti-G <sup>+</sup> bacteria.	
B	抗灿烂弧菌、尖孢镰刀菌。 Anti- <i>V. splendidus</i> , <i>F. oxysporum</i> .	
C	抗灿烂弧菌。 Anti- <i>V. splendidus</i> .	抗海水派金虫 anti- <i>P. marinus</i>
D	抗 G <sup>-</sup> 细菌, 如金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌, 但杀菌力小于 Mytilin C, 也抗尖孢镰刀菌。 Anti-G <sup>-</sup> bacteria, such as <i>S. aureus</i> , <i>M. luteus</i> , but its bactericidal effect is weaker than mytilin C. Anti- <i>F. oxysporum</i> .	
G1	抗 G <sup>-</sup> 细菌, 活性强于 Mytilin D Stronger than mytilin D in anti-G <sup>-</sup> bacteria.	具有溶胞作用。 induce cytolysis
Mytimycin	延滞一些真菌的生长, 如黄色镰孢, <i>Nowakowskiella crassa</i> 等。 Block growth of some fungi, such as <i>F. culmorum</i> , <i>Nowakowskiella crassa</i> etc.	
MDs		
A	主抗 G <sup>-</sup> 细菌, 包括一些海洋无脊椎动物病原。 Anti-G <sup>-</sup> bacteria mainly, as well as some pathogens of marine invertebrates	
B	主抗 G <sup>-</sup> 细菌, 包括一些海洋无脊椎动物病原。 Anti-G <sup>-</sup> bacteria mainly, as well as some pathogens of marine invertebrates	

72 h 后的情况)。锉擦贻贝 6 h 后 MGD2 的 mRNA 浓度会增加, 锉擦 24 h 后尤其明显。热休克 (33°C) 贻贝 90 min, 其血细胞 RNA 显出与 MGD2 cDNA 的带杂交, 强度明显增加, 在热休克后转至 15°C 24 h, 此杂交强度逐渐降至对照水平。MGD2 基因表达呈现出为热压力所调整。锉擦和热休克贝壳使 MGD2 信使水平大为提高, 意味着压力下该基因表达可能诱导出来。化脓性损伤触发循环血细胞中 MGD2 信使浓度增加<sup>[4]</sup>。

贻贝在不同发育期, MGD2 是受调控的, 但直至幼体附着和变态后未测出基因表达。在卵期、幼体阶段或早期的幼体后期均无 MGD2 基因信号, 至幼体后期第 2 天, 才有微弱的信号并增至受精后 32 d, 在血细胞中有高水平的表达, 但总的成体组织中未测出转录。成体贻贝在受物理和温度压力时, MGD 的基因可能是过渡表达的, 当受细菌挑战时表达则减退<sup>[4]</sup>。编码 MGD 的同工型的基因已克隆出来并测完其序列, 结果揭示出它有 4 个外显子, 3 个内显子。MGD 基因可能以 1 个单拷贝存在于基因组之中。

MGD2 样物质主要分布在 2 种血细胞亚型中, MGD 的基因是连续表达的, 且经细菌攻击后不被诱导, MGD 基因表达水平变化发生在幼体变态期及之后。3 个不同 cDNA 共享一个高度同源, 即相当于 MGD 的 1 个 cDNA 片段, 相当于 MGD 的 cDNA 及相当于 MGD2b 的 cDNA 片段。

成熟的 MGDs 之列阵和半胱氨酸排位如下 (C 为 2 个防卫素共有的半胱氨酸列阵):

M GD1 GFG C PNNYQ C HRH C KSIPGR C GGY  
M GD2 GFG C PNNYA C HQH C KSIRGY C GGY  
C GGW HRLR C T C YR C G  
C AGW FRLR C T C YR C G

MGD2 是 1 个新的 MGD 同工型, 是在筛选血细胞 cDNA 文库中描述出 MGD 的 cDNA 特征的。

MGDs 具有原始前体结构, 在血细胞中合成和加工。MGDs 参与后来的全身性防卫过程。可能在抗感染过程中的不同阶段, 对抗不同病原中发挥作用<sup>[1]</sup>。

## 2 Myticins

1999 年, Mitta 等<sup>[5]</sup>分离地中海贻贝血细胞和血浆得出一类新的富半胱氨酸抗微生物肽, 即 Myticin。它共有 A、B 两个同工型。

血细胞外, Myticin A 还分离自地中海贻贝的血浆 (未经细菌诱导的), 之后, Myticin B 又从食用贻贝血细胞中分离出来。

Myticin A 分子量为 4.43 kD (4437.28 ± 2.46) Da, 含 40 个残基, 包括 8 个半胱氨酸残基或 4 个二硫键。Myticin A 初级结构中的半胱氨酸列阵不同于以前描述过的许多富半胱氨酸抗微生物肽。克隆的 cDNAs 序列分析表明其前体由带有 20 个氨基酸的推

断性信号肽的 96 个氨基酸和 36 个残基的 C- 端伸展组成。该肽是在血细胞中作为前蛋白原合成的, 然后在该活性肽贮存之前经各种解脲过程加工而成, 其前体主要在血细胞中表达<sup>[5]</sup>。

Myticin A 有 3 个残基的 N- 端序列, 包括 7 个烷基化半胱氨酸, 其序列为:

HSHA CTSYW CGKFCGTASCTHYLCRV LHPGKM CACV

从表 1 中看到, Myticin A 有明显杀伤作用, 如对藤黄微球菌、巨大芽孢杆菌和绿色气球菌 (*A. viridans*) (最小杀菌浓度 MBC 为 2.25~4.5 μM), 但对原生动植物寄生虫 (如美洲巨蛭) 则没有活力。

Myticin B 分子量为 (4563.45 ± 1.32) Da, 有 8 个半胱氨酸残基。部分 N- 端序列获得包含 1 个烷基化半胱氨酸的 7 个残基。

Myticin B 对 G<sup>-</sup> 细菌的最小杀菌浓度 (MBC) 为 1~2 μM 对 G<sup>-</sup> 细菌大肠埃希氏菌 (*E. coli*) D3 则有中等活性 (MBC 为 2.0~10 μM) 对丝状真菌尖孢镰刀菌的最小抑菌浓度 (MIC) 为 5~10 μM

Myticins 的氨基酸序列如下 (C 为 2 个防卫素共有的半胱氨酸阵列):

A HSHA CTSYW CGKFCGTASCTHYLC  
B HPHV CTSYY CSKF CGTAGCTRYGC  
RV LHPGKM CACV HCSR  
RNLHRGKL CFC LHC SR

Myticin 基因以单拷贝存在于基因组中, 至少含有 1 个内显子——其剪接部位位于衔接点, 遵从 GF-AG 规则。这是与规范的外显子—内显子衔接点共有的序列。Myticins 从 96 个残基组成的前体分子加工来, 该前体含 1 个有 20 个氨基酸残基的信号肽, 1 个有 40 个残基的成熟肽和附加的 36 个残基的 C- 端序列。成熟的 Myticin 可经常规加工机制产生, 首先释放前一片断, 然后内蛋白酶 R 在 40 位和 41 位上的 N- V 间剪切。20 个残基的 N- 端片断假设是易位到糙面内质网的管腔的 1 个信号序列。C- 端部分的功能意义不明, 在 2 个同工型间高度保守且同工型 A 和 B 分别含 5 个和 6 个酸性氨基酸, 该酸性区可与肽的阳离子部分作用而稳定前体的结构, 以进行解脲过程或阻止碱性肽部分的膜相互作用。Myticin 的 C- 端伸展可作为将 1 个信号交付给该肽至 1 个特定的血细胞部位而作用。此蛋白质部分在成熟肽后的这种定位对无脊椎动物抗微生物肽前体而言是不一般的。

贻贝血细胞是 Myticins 的生产和贮存位点, 也是 Myticin 前体产生位点。Myticins 在血细胞富细胞器

部分的酸性浸汁中很丰富。Myticins 在血细胞中从 mRNA 加工为活性肽。未经细菌诱导的贻贝, 也可能已处于刺激的免疫状态, 从而导致血浆中该肽的释放和血细胞活化。

Myticins 的三维结构高度束缚。其一级结构中的半胱氨酸位置不同于以往描述的无脊椎动物富半胱氨酸抗微生物肽, 如昆虫防卫素、大防卫素、果蝇抗真菌肽 tachyplesine (最先分离自日本鲎细胞的防卫素)、死亡素、buthimine、mytilin、MGD1、peraedine (白对虾血细胞抗微生物肽)、哺乳动物防卫素 Protegrins、brevinins (猪白细胞小分子抗菌肽) 和植物防卫素 r-thionins、Ib-AMP1-4 等。Myticin 还具有溶菌作用, 但比 Mytilin 的慢得多。Myticin 作为其他抗微生物肽的一个合作者参与贻贝免疫。

Myticin 基因在血细胞中充分表达, 在外膜、触唇和鳃里其 RNAs 显出有与此相同迁移率的淡带<sup>[3,6]</sup>。

### 3 Mytilins

Mytilins 分子富含半胱氨酸 (8 个 Cys-), 共 34 个残基, 分子量约为 3877.79 Da。Mytilins 的三维结构高度束缚, 一级结构中的二硫键的连接和半胱氨酸阵列不同于迄今已知节肢动物、蛙、哺乳动物或植物的富半胱氨酸的抗微生物肽。Mytilins (同工型 A 和 B) 在贻贝血中的浓度约 22 μM, 这是所试多数细菌的 MIC 范围。它们抗 G<sup>-</sup> 细菌的活性强于抗 G<sup>+</sup> 细菌。

Mytilin 包括 5 个同工型, 它们分别是 Mytilin A、Mytilin B、Mytilin C、Mytilin D 和 Mytilin G1。Mytilin A 和 Mytilin B 分离自食用贻贝血浆, Mytilin B、Mytilin C、Mytilin D、Mytilin G 来自地中海贻贝血细胞。

Mytilin A, 分子量为 3773.7 Da, 含 34 个氨基酸残基, 包括 8 个 Cys-。在其分子的 2 位上是 Gly- (甘氨酸残基)。对 G<sup>-</sup> 细菌的抗性大于对 G<sup>+</sup> 细菌。如抗藤黄微球菌、大肠埃希氏菌等。它能使遭遇到的细菌在几秒钟内胞质膜的通透性屏障瓦解, 部分去极化, 膜质 ATP 减少, 呼吸受抑制直至死亡<sup>[7,8]</sup>。

Mytilin B 含 34 个残基, 其中有 8 个 Cys-, 分子量约 3974.3 Da 或 (3973.09 ± 0.95) Da。在血浆中的浓度约 2 μM。对抗相关微生物如尖孢镰刀菌和灿烂弧菌的 MIC 只需几分钟就可达到。Mytilin B 作为血细胞中加工成活性化合物的前体分子而产生。该前体由 22 个残基前片断, 34 个残基的成熟肽和 48 个富酸性氨基酸残基的 C- 端序列组成。Mytilin B 的信使和该肽存在于肠细胞 (包括潘尼氏细胞) 的颗粒结构中, 得到细菌诱导的贻贝之 Mytilin B 信使浓度在循环血细胞

中暂时减少,其后在血浆中浓度增加,超过 MIC,参与抗微生物的局部防卫,以杀灭细菌。Mytilin B是发育调节的,在幼体附着和变态之后,其基因不表达。该基因含 4 个外显子,3 个内显子<sup>[7]</sup>。

Mytilin C 分子量为 (4 287.05 ± 0.29) Da,含 31 个残基,其中有 7 个为 Cys-。对抗(杀死)细菌如灿烂弧菌的 MIC 仅需几分钟即显现出来。另外它也抗原生动物海水派金虫 (*Perkinus marinus*)。Mytilin C 同 Mytilin B 的一级结构中均共享 1 个高度同源,两者功能互补。

Mytilin D 分离自地中海贻贝,分子量约 3877.79 Da,含 34 个残基,包括 8 个 Cys-。分子中只有 1 个氨基酸不同于 Mytilin A,即在 25 位上有 Arg(精氨酸),而不是 Gly(甘氨酸)。Mytilin D 的主要生物学活性是明显拮抗 sG 和 G- 细菌。但杀菌力(对藤黄微球菌和金黄色葡萄球菌)小于 Mytilin C 和 Mytilin G 的。Mytilin D 对尖孢镰刀菌的活性也较强<sup>[7]</sup>。

Mytilin Galloprovincialis 1(即 Mytilin G1),分离自地中海贻贝血浆。其分子量为 4118.3 Da,含 36 个氨基酸残基,包括 8 个 Cys-。与其他 Mytilins 共享一致的半胱氨酸列阵。但与它们只有有限的同源。Mytilin G 仅对 G- 细菌有活性。其 MIC 需 6 h 才显出。其浓度达 5.6 μM 时,对金黄色葡萄球菌和尖孢镰刀菌也不显活性。此外 Mytilin G 还具溶胞作用<sup>[7,8]</sup>。

上述 Mytilins 的抗微生物活性详见表 1

Mytilins 的 5 个同工型的氨基酸序列如下 (C 为 2 个防卫素共有的半胱氨酸列阵):

A	G C A S R C K A K C A G R R C K G W A S A S F R G R C Y
B	S C A S R C K G H C R A R R C G Y Y V S V L Y R G R C Y
C	S C A S R C K S R C R A R R C R Y Y V S V R Y G G F C Y
D	G C A S R C K A K C A G R R C K G W A S A S F R R R C Y
G1	V V T C G S L C K A H C T F R K C G Y F M S V L Y H G R C Y
	C K C F R C
	C K C L R C
	C R C C
	C K C F R C
	C R C L L C

富多样性的 Mytilin 同工型具多样性的生物学意义,其生物学活性互补,共同抑杀入侵者。

37% 的循环血细胞含 Mytilins,主要贮存于颗粒细胞,特别是表达大颗粒(即溶酶体样结构)的血细胞中,并浓缩于大颗粒。与防卫素(MDAs)两者似乎部分地分布于同一或不同的血细胞亚群中。含 Mytilin 的粒细胞可包含在抗感染反应的不同阶段及吞噬细胞中。Mytilin 在血浆中的增加是通过脱粒作用实现的,然后再释放入循环系统作全身抗微生物反应。其

基因是组成性的,不随细菌挑战而被诱导。Mytilin 广泛分泌(包括经胞泌作用的释放)进入与血细胞直接的环境中向细菌入侵位点转运,在胞内对被卷入的细菌行使杀死作用。含有 Mytilin 的免疫反应性细胞(亚型及多泡囊颗粒)吞噬细菌,首先在吞噬小体样结构中内化细菌,致细菌与 Mytilin 共同位于(相)同一细胞器并融合。Mytilin 表达细胞很少或不在消化管道上皮中表现,但在鳃中也表达得很好。在与外环境相连的表皮中,Mytilins 阳性细胞特别丰富,从而构成阻止病原入侵的第一道防线。

Mytilin cDNA 分离自血细胞 mRNA。血细胞是 Mytilin 及其前体合成位点。Mytilin 在血细胞中加工为活跃化合物<sup>[4]</sup>。

总之,Mytilins 是包含在对感染的反应之中,它们可在几小时内由血细胞转至感染部位,与被卷入的细菌同处,随后即杀灭之。血细胞的脱粒作用促使其浓度在血浆中增加,并作全身性抗微生物反应。Mytilins 的释放使血浆浓度超过必要的 MBC 值以杀死多数入侵细菌。

### 4 Mytimycin

Mytimycin 分离自未经病原诱导的食用贻贝血浆,分子量为 6.3 kD,有 32 个残基,包括 12 个 Cys-。Mytimycin 是专抗真菌的贻贝肽,已获得含 32 个残基的 NH- 端的部分序列,它约相当于全序列的一半。在蛋白质资料库中未搜索到与此有任何同源的肽。该肽对一些真菌的生长有延滞作用。Mytimycin 有很紧密的结构形式,其部分的 NH- 端序列如下<sup>[7,9]</sup>:

DCCRK PFRK ACW DCT AGTPY YGYSTRNIFGCTC  
.....

### 5 结语

迄今的贻贝防卫素研究成果主要在法国,可见法国养殖贻贝史的悠久、经济价值的重要及对其先天免疫研究的重视。我国贻贝的规模养殖至今已有 40 余年,也存在一定的病害问题,可是迄今,未见到任何关于防卫素等抗微生物肽及先天免疫的研究报道。尽管养殖中的贻贝能较好适应环境,也不易为重病所折磨,但我国的贻贝是否有防卫素等抗微生物肽在防御敌害,在保卫自身的活动中起作用,是值得研究课题。人们可以从贻贝防卫素成果获得启发,以遗传选择或与贻贝类软体动物先天免疫为基础,增强养殖贝类的免疫能力,改进品质,提高产量。

### 参考文献

1 Hubert F, Noël T, Roch F. A member of the arthropod defensin family from edible mediterranean mussels (*Myti-*

lus galloprovincialis). Eur J Biochem, 1996, 240 302~306.

- 2 Yang Y S, Mitta G, Chavaniere A et al. . Solution structure and activity of the synthetic four-disulfide bond mediterranean mussel defensin (MGD-1). Biochem, 2000, 39(47): 14436~ 14447.
- 3 Mitta G, Vandembulcke F, Hubert F et al. . Mussel defensins are synthesized and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. J Cell Sci, 1999, 112 4233~ 4242.
- 4 Mitta G, Hubert F, Dyrudya E A et al. . Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels gene structure and expression analysis. Dev Comp Immu, 2000, 24 381~ 393.
- 5 Mitta G, Hubert F, Noël T et al. . Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Eur J

Biochem, 1999, 265 71~ 78.

- 6 Mitta G, Vandembulcke F, Noël T et al. . Differential distribution and defence involvement of antimicrobial peptides in mussel. J Cell Sci, 2000, 113 2759~ 2769.
- 7 Charlet M, Chernysh S, Philippe H et al. . Innate immunity isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusk, *Mytilus edulis*. J Bio Chem, 1996, 271(36): 21808~ 21813.
- 8 Mitta G, Vandembulcke F, Hubert F et al. . Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. J Bio Chem, 2000, 275(177): 12954~ 12962.
- 9 Mitta G, Vandembulcke F, Rock P. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. FEBS Letters, 2000, 486 185~ 190.

(责任编辑: 邓大玉 曾蔚茹)

(上接第 128 页 Continue from page 128)

了金额达 270 万美元的大豆。根据美国政府规定, 生产作为药物或工业用途蛋白的转基因植物是不宜作为食品供人们食用的。虽然大多数的蛋白很快会被人体消化, 可是有些蛋白可有足够长的时间存留在人体, 可能危害到人体的健康。因此, 医药用途的转基因作物不允许作为人的食物或牲口的饲料。科学家也曾多次警告, 这类转基因作物如果被批准商业化生产而大面积向环境释放, 很可能通过基因流污染常规的农作物, 也有可能是在运输及仓储过程中与食用作物种子混到一起, 因此还是有相当风险的。对这一事件, 美国政府官员表示, 这些混杂了转基因玉米的大豆很可能会被烧毁或转化为燃料。这是一件美国政府按预先防范的原则来处理生物安全的一个好事例。

为了确保食品安全, 国际上近年来越来越盛行有机食品。不仅发达国家都在生产有机食品, 据统计世界上生产有机食品的国家已达 100 个以上。所谓的有机食品是指在生产中绝对不允许使用化学农药、化肥、除草剂; 不许采用基因工程技术、抗生素和离子辐射技术; 合理轮作, 防止水土流失, 保护生物多样性。美国目前在市场上销售转基因作物产物及其制成的各种食品已达 300 种左右。经过 7 年的研究讨论、调整和谈判, 美国农业部关于带有“有机”标签的食品在市场上销售的规定终于在 2002 年 10 月 21 日生效, 被人们称为是“美国农业的一个里程碑”的事件。按照美国农业部规定, 凡是有机程度达到或超过 95% 的食品, 都可贴上 1 个专门的“有机”标签。有机与非有机食品必须分开出售, 2 种食品之间必须有隔离物。如发现有机食品被非有机食品污染, 当事人将被罚款, 款额可高达 1 万美元。

总之, 生物技术将成为 21 世纪高新技术中一项重要的技术, 发展也会非常迅速, 有人估计仅转基因作物一项, 预计到 2010 年产值就可达到 200 亿美元。在发展生物技术的同时, 重视生物安全也是重要的。

#### 参考文献

- 1 钱迎倩. 生物多样性与生物技术. 中国科学院院刊, 1994, (2): 134~ 138.
- 2 Mikkelsen T R. The risk of crop spread. Nature, 1996, 380 (6569): 31.
- 3 钱迎倩. 转基因作物的利弊分析. 生物技术通报, 1999, 15 (5): 7~ 11.
- 4 魏伟, 马克平. 如何面对基因流和基因污染. 中国农业科技导报, 2002, 4(4): 10~ 15.
- 5 张永革, 吴孔明, 彭于发等. 转基因植物的生态风险. 生态学报, 2002, 22(11): 1951~ 1959.
- 6 生物多样性公约秘书处. 生物多样性公约——卡塔赫纳生物安全议定书. 正文和附件. 蒙特利尔: 生物多样性公约秘书处, 2000.
- 7 Hall L, Topinka K et al. . Pollen flow between herbicide-resistant *Brassica napus* is the cause of multiple-resistant *B. napus* volunteers. Weed Science, 2000, 48 688~ 694.
- 8 Beckie H J, Hall L M et al. . Impact of herbicide-resistant crops as weeds in Canada. Proceedings Brighton Crop Protection Council Conference—Weeds, 2001, 135~ 142.
- 9 Dalton R. Transgenic corn found growing in Mexico. Nature, 2001, 413 337.
- 10 Quist D, Chapela I H. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Mexico. Nature, 2001, 44 541~ 543.
- 11 Gills J. Soybeans mixed with altered corn. Washington Post, 2002, 13.

(责任编辑: 邓大玉)