

蛙类皮肤分泌物中小分子多肽的活性研究

罗 迅¹, 张业涛¹, 安乐乐^{1,2}, 杨海红¹, 赵永清^{1,2*}

(1. 西北民族大学生命科学与工程学院, 兰州 730100; 2. 西北民族大学生物医学研究中心, 兰州 730100)

摘要: **目的** 探究西北地区四种蛙类(花背蟾蜍、中国林蛙、中华大蟾蜍、非洲爪蟾)皮肤分泌物中小分子多肽的抗菌活性, 评估其对病原菌及 huh7 癌细胞的抑制作用, 挖掘其抗菌、抑癌潜力及分子机制。 **方法** 通过物理刺激法收集皮肤分泌物, 经高效液相色谱分离鉴定抗菌肽成分, 优化试验条件, 采用纸片扩散法检测其对七种病原菌的抑菌活性, 并利用 CCK-8 试剂盒评估其对 huh7 细胞的增殖抑制作用。 **结果** 中华大蟾蜍皮肤分泌物中抗菌肽种类最丰富(15种), 对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌等五种病原菌的抑菌圈直径均超 20 mm, 显著优于其他蛙类; 其对 huh7 细胞的抑制效果亦最强, 100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下细胞凋亡率显著上升。花背蟾蜍次之, 而中国林蛙和非洲爪蟾效果较弱。 **结论** 不同蛙类皮肤分泌物中抗菌肽在成分、抗菌及抑癌活性上存在显著差异, 中华大蟾蜍抗菌肽展现出最强潜力, 为新型抗菌、抗癌药物研发提供了重要分子资源及理论依据。

关键词: 蛙类; 皮肤分泌物; 小分子多肽; 抗菌; 抗癌

0 引言

两栖类动物长期生活在潮湿环境中, 其裸露的皮肤在进化过程中形成了独特的防御机制, 以抵御病原微生物的入侵。皮肤分泌物作为这一机制的重要组成部分, 富含生物胺及活性抗菌多肽, 是生物胺与抗菌肽的巨大储库。抗菌肽作为生物免疫系统产生的多肽类物质, 具有广谱的抗菌、抗真菌、抗病毒及抗肿瘤活性, 已成为当前抗病原微生物药物研究的热点^[1-4]。本研究聚焦于西北地区不同蛙类(花背蟾蜍、中国林蛙、中华大蟾蜍及非洲爪蟾)的皮肤分泌物, 旨在探讨其小分子多肽的抗菌肽活性及其对病原菌和癌细胞生长的影响。通过高效液相色谱法(HPLC)分离鉴定蛙类皮肤分泌物中的抗菌肽成分, 并采用纸片扩散法和细胞活力检测法评估其抑菌及抑癌活性。本研究不仅有助于揭示蛙类皮肤分泌物中抗菌肽的多样性及其生理适应性差异, 更为新型抗菌、抗癌药物的研发提供了重要的分子资源和理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料

实验动物采集于西北兰州地区, 包括花背蟾蜍、中国林蛙、中华大蟾蜍及非洲爪蟾(实验室自有饲养动物),

huh7 细胞为西北民族大学生物医学研究中心提供细胞株; 金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、地衣杆菌、沙门氏菌、绿脓杆菌、葵肠杆菌、枯草芽孢杆菌^[5]。

1.2 主要试剂与器材

高效液相色谱仪、酶标仪、灭菌锅、细胞培养箱、空冷冻干燥机、摇床、恒温培养箱、乙醚、去甲肾上腺素、三氟乙酸、乙腈、营养肉汤、营养琼脂、CCK-8 试剂盒(赛维尔生物科技有限公司), 活细胞动态观测仪。

1.3 方法

1.3.1 蛙类皮肤分泌物的收集

采用两种方法诱导皮肤分泌物分泌: ①背部淋巴囊注射去甲肾上腺素(0.1 mg/g 体重); ②乙醚蒸气刺激(将蛙置于含乙醚的密闭容器中 5 min)。后续采用浓度为 0.05% 的三氟乙酸溶解分泌物, 离心后取上清液, 再进行真空冷冻干燥获得其干粉, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

1.3.2 抗菌肽的成分检测

用含 0.05% 三氟乙酸(TFA)的去离子水按 1 mg/mL 的比例对四种抗菌肽的冻干粉进行稀释, 搅拌 30 min 充分溶解后离心($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $10000\times\text{g}$, 20 min), 收集上清液用 0.22 μm 的滤膜过滤, 准备检测抗菌肽中的有效成分^[6]。

采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC), 经过试验条件

基金项目: 甘肃省自然科学基金项目(21JR1RA221); 兰州市科技计划项目(2023-1-31); 中央高校基本科研项目(31920220050)。

第一作者: 罗迅, 硕士, 研究方向为兽医学细胞工程。

*** 通信作者:** 赵永清, 博士, 副教授, 研究方向为天然小分子肽对动物病毒性疾病的作用。E-mail: 450883800@qq.com

优化, 选用 C18 色谱柱, 乙腈为流动相进行洗脱, 采用乙腈-水-三氟乙酸作为洗脱系统, 实施 4% 到 70% 的梯度洗脱, 流速控制在 1 mL/min, 收集 214 nm 下的洗脱峰, 获得小分子多肽的组分。

1.3.3 抗菌肽对抑菌活性研究

采用纸片扩散法, 以大肠杆菌、地衣杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、粪肠杆菌、绿脓杆菌和沙门氏菌七种常见病原菌为对象开展抑菌实验。将 0.22 μm 滤膜过滤好的抗菌肽溶液, 稀释至同等浓度 1 mg/mL。制作抗菌肽试纸: 将滤纸剪成小圆片(直径 10 mm), 在低温下浸泡于不同蛙类获得的抗菌肽溶液中 24 h(对照为无菌水浸泡的滤纸)^[7-9]。病原菌的培养: 选取大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌等七种病原菌株在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行振荡培养, 并观测其生长状况。抑菌试验: 不同菌株的菌液涂布于营养琼脂培养基上, 并在中央贴上已经浸泡了多肽 12 h 的滤纸片, 同时以无菌水滤纸片作为对照, 同时进行培养。分别观测 24 h 的抑菌圈情况。

1.3.4 抗菌肽对 Hela 细胞生长活力的影响研究

取传代好的 huh7 细胞, 放置于二氧化碳培养箱中在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行培养, 二氧化碳浓度为 5%, 观测其 12、24、48 h 细胞生长状态和活力进行记录。

huh7 细胞正常传代, 当细胞汇合率达到 90% 时加入胰酶消化细胞, 用血球计数器在显微镜下进行计数, 将细胞密度调整至 $2 \times 10^4/100 \mu\text{L}$ 接种 100 μL 于 96 孔板培养过夜之后, 加入 6 种不同浓度的四种不同种类多肽使其终浓度为 200、100、50、25、12.5、6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中继续孵育, 每组设 5 个复孔, 并设立空白对照组, 多肽分别作用于 huh7 细胞 12、24 h 和 48 h 后向

96 孔板中每孔分别加入 10 μL CCK-8 溶液。

酶标仪 450 nm 处检测各孔吸光值(OD), 记录结果, 求其平均值, 同时计算细胞生长增殖率(%). 细胞相对活力(%) = 加药组平均 A 值 / 对照组平均 A 值 $\times 100\%$ ^[10]。

2 结果与分析

2.1 四种不同抗菌肽的成分检测

结果显示, 中华大蟾蜍皮肤分泌物中检测到 15 种有效抗菌肽成分, 非洲爪蟾有 8 种, 花背蟾蜍有 12 种, 而中国林蛙则有 7 种。这些成分的存在不仅丰富了蛙类皮肤分泌物中抗菌肽的多样性, 也为后续研究提供了丰富的物质基础。通过对比不同蛙类抗菌肽的种类和数量, 可以初步推测它们在进化过程中可能形成了各自独特的防御机制, 以适应不同的生存环境。

2.2 抗菌肽对七种病原菌的抑制效果

实验表明, 不同蛙类皮肤分泌物抗菌肽对七种病原菌抑制作用有别。中华大蟾蜍皮肤分泌物抗菌肽对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌等五种病原菌抑制效果突出, 抑菌圈直径超 20 mm; 非洲爪蟾皮肤分泌物抗菌肽对枯草芽孢杆菌、绿脓杆菌、沙门氏菌抑制作用较明显; 花背蟾蜍和中国林蛙皮肤分泌物抗菌肽虽对部分病原菌有抑制作用, 但整体效果稍弱。表 1 详细列出了不同蛙类皮肤分泌物多肽对七种病原菌生长抑制的抑菌圈直径数据。通过对比分析, 可以进一步确认中华大蟾蜍皮肤分泌物中的抗菌肽在抗菌活性方面具有显著优势。这些结果不仅揭示了不同蛙类皮肤分泌物中抗菌肽种类的差异, 也反映了物种间在遗传生理适应性上的差异。

表 1 不同蛙类皮肤分泌物多肽对七种病原菌生长抑制抑菌圈的直径

不同蛙种类	大肠杆菌/mm	地衣杆菌/mm	金黄色葡萄球菌/mm	枯草芽孢杆菌/mm	粪肠杆菌/mm	绿脓杆菌/mm	沙门氏菌/mm
中华大蟾蜍	17.59 \pm 0.73	15.42 \pm 2.48	23.24 \pm 3.98	22.22 \pm 0.94	27.24 \pm 1.98	21.94 \pm 1.34	19.22 \pm 0.94
非洲爪蟾	12.2 \pm 2.51	11.21 \pm 5.23	14.09 \pm 1.28	22.69 \pm 3.08	13.09 \pm 1.28	22.98 \pm 2.15	23.69 \pm 3.08
花背蟾蜍	11.13 \pm 1.23	10.25 \pm 3.04	11.09 \pm 0.66	16 \pm 1.73	12.09 \pm 0.66	11.69 \pm 0.72	13 \pm 1.73
中国林蛙	13.19 \pm 0.31	19.3 \pm 1.32	12.06 \pm 1.91	25.37 \pm 2.11	22.86 \pm 1.91	20.94 \pm 2.18	11.37 \pm 2.11

2.3 抑癌活性的测定

实验结果显示, 随着抗菌肽浓度的增加, huh7 细胞的凋亡率显著上升。在 12 h 实验中, 中华大蟾蜍和花背蟾蜍皮肤分泌物中的抗菌肽对 huh7 细胞的抑制效果尤为显著。随着作用时间的延长(24 h 和 48 h), 这种抑制效果更加明显。特别是中华大蟾蜍皮肤分泌物中的抗菌肽, 在较高浓度下几乎完全抑制了 huh7 细胞的生长。

通过显微镜观察发现, 中华大蟾蜍和花背蟾蜍来源的小分子多肽(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)显著抑制了 huh7 细胞的生长, 细

胞数量减少, 并呈现死亡特征(如体积缩小、细胞碎片增多)。相比之下, 中国林蛙和非洲爪蟾皮肤分泌物中的抗菌肽虽然也对 huh7 细胞有一定的抑制作用, 但效果相对较弱。这些结果表明, 不同蛙类皮肤分泌物中的抗菌肽在抑癌活性方面存在显著差异。

2.4 四种小分子多肽对 Huh7 细胞的影响

综合以上实验结果, 可以初步探讨抗菌肽成分与其抗菌、抑癌活性之间的关系。首先, 从成分种类来看, 中华大蟾蜍皮肤分泌物中抗菌肽的种类最为丰富, 这可能与其

在进化过程中形成的独特防御机制有关。丰富的抗菌肽种类为中华大蟾蜍提供了更广泛的抗菌谱和更强的抗菌能力。

其次, 从抗菌活性来看, 中华大蟾蜍皮肤分泌物中的抗菌肽对多种病原菌均表现出显著的抑制作用, 这与其抗菌肽成分的多样性和复杂性密切相关。不同种类的抗菌肽可能通过不同的作用机制来抑制病原菌的生长和繁殖, 从而形成协同作用, 提高整体的抗菌效果。

最后, 从抑癌活性来看, 中华大蟾蜍皮肤分泌物中的抗菌肽对 huh7 细胞具有最强的抑制潜力。这可能与抗菌肽成分中的某些特定结构或功能域有关。这些结构或功能域可能通过与癌细胞表面的特定受体结合, 触发细胞内的信号传导途径, 导致癌细胞凋亡或生长抑制。然而, 需要注意的是, 抗菌肽成分与其活性之间的关系并非简单的线性关系。不同种类的抗菌肽可能具有不同的作用机制和靶点, 因此其活性也会受到多种因素的影响。

3 讨论与结论

本研究聚焦于西北地区四种蛙类(花背蟾蜍、中国林蛙、中华大蟾蜍、非洲爪蟾)皮肤分泌物中小分子多肽的抗菌及抑癌活性, 通过高效液相色谱分离鉴定抗菌肽成分, 并采用纸片扩散法和 CCK-8 试剂盒评估其对病原菌及 huh7 细胞的抑制作用。研究结果显示, 不同蛙类皮肤分泌物中抗菌肽在成分、抗菌及抑癌活性上存在显著差异。

中华大蟾蜍皮肤分泌物中抗菌肽种类最为丰富, 达到 15 种, 对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌等五种病原菌的抑菌圈直径均超过 20 mm, 显著优于其他蛙类。同时, 其对 huh7 细胞的抑制效果亦最强, 在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下细胞凋亡率显著上升。花背蟾蜍次之, 而中国林蛙和非洲爪蟾效果较弱。这些结果表明, 中华大蟾蜍皮肤分泌物中的抗菌肽具有最强的抗菌和抑癌潜力。

从抗菌活性来看, 中华大蟾蜍皮肤分泌物中的抗菌肽对多种病原菌均表现出显著的抑制作用, 这与其抗菌肽成分的多样性和复杂性密切相关。不同种类的抗菌肽可能通过不同的作用机制来抑制病原菌的生长和繁殖, 从而形成协同作用, 提高整体的抗菌效果。从抑癌活性来看, 中华大蟾蜍皮肤分泌物中的抗菌肽对 huh7 细胞具有最强的抑制潜力, 这可能与抗菌肽成分中的某些特定结构或功能域有关。

本研究不仅揭示了蛙类皮肤分泌物中抗菌肽的多样

性及其生理适应性差异, 更为新型抗菌、抗癌药物的研发提供了重要的分子资源和理论依据。未来研究应进一步深入探讨抗菌肽成分与其活性之间的关系, 以及抗菌肽在生物体内的代谢途径和作用机制。同时, 需对中华大蟾蜍分泌物多肽的有效组分、二级结构、活性中心和重要基因进行深入研究, 研究分析各种组分的相应生物活性功能, 以期获得显著且具有应用开发价值的小分子活性肽。

参考文献

- [1] 田竺青, 杨隆兵, 朱丽娟, 等. 家蝇新型抗菌肽抗肿瘤活性研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(11): 1207-1210.
- [2] MORETTA A, SCIEUZO C, PETRONE A M, *et al.* Antimicrobial peptides: A new hope in biomedical and pharmaceutical fields [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 668632.
- [3] WHITE J H. Emerging roles of vitamin D-induced antimicrobial peptides in antiviral innate immunity [J]. *Nutrients*, 2022, 14(2): 284.
- [4] 陆世海, 崔建东, 张大虎, 等. 小分子活性肽定向酶解和分离关键技术研究及其应用[R/OL]. (2023-05-30) [2024-12-05]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=iIrmkp53Lzz-DJ13QZ0eulbzXz3rZY6fJDCkhKbyRtJtqeyNa6Axw14uA9TgBB4OYCyZjU_J1nLcbMViLDaDZLOTC4-T87QAqrpoT1I5n46lG_cvrldiMJ7RIRbJckMdu5evIKCKdM2mHHx_KAapP5bo0-9_Yr0_WIPikMbFHU=&uniplatform=NZKPT.
- [5] 刘炯宇, 江建平, 谢锋, 等. 两栖动物皮肤结构及皮肤抗菌肽[J]. *动物学杂志*, 2004, 39(1): 112-116.
- [6] 田颖. 鲨素抗菌肽对海兰褐蛋鸡产蛋后期蛋品质及子宫 CaBP-D28k mRNA表达量影响的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [7] 马宁, 马玉雪, 王海玉, 等. 两栖类动物皮肤分泌物的相关研究[J]. *当代畜禽养殖业*, 2018, (10): 6-7.
- [8] 胡俊. 拮抗性芽孢杆菌的筛选及其抗菌肽的分离和性质分析[D]. 芜湖: 安徽工程大学, 2017.
- [9] 戴碧鑫, 董碧莲, 蔡延渠, 等. 黄芩原药材、药渣的黄芩苷含量测定及体外抗菌活性研究[J]. *广州中医药大学学报*, 2020, 37(4): 722-725.
- [10] 李晓文, 周越菡, 邓健志, 等. 穿心莲内酯对急性淋巴细胞白血病细胞的生长抑制及凋亡诱导作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(6): 977-984.