论 著 文章编号:0253-3626(2008)12-1430-04

家蝇幼虫抗菌肽对阴沟肠杆菌感染小鼠创面的抗菌活性

陈 曼[1],文阳安[2],刘银河[2],周义文[3],涂植光[2]

(1. 成都医学院医学检验系,成都 610083;2. 重庆医科大学医学检验系临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,重庆 400016;3. 深圳市孙逸仙心血管医院检验科,深圳 518035)

【摘 要】目的:观察抗菌肽对阴沟肠杆菌感染小鼠创面的抗菌作用。方法:超声处理诱导家蝇幼虫产生抗菌肽,经分离纯化后,体外实验分析抗菌肽的抑菌特性。取 ICR 小鼠 30 只,切除背部 1 cm × 1 cm 全层皮肤,涂抹阴沟肠杆菌菌液作为感染模型,随机分为 3 组。伤后 2 h 和每天各组分别用等渗生理盐水、100 g/L 的磺胺米隆或 0.1 g/L 抗菌肽滤纸湿敷,伤前和伤后 3 d 抽血观察白细胞变化;伤后 3 d 痂下肌肉组织细菌定量和计算存活率。结果:抗菌肽纯化蛋白对阴沟肠杆菌的抑菌活性较强;术后 3 组白细胞记数均减少,对照组显著低于其他两组($P<0.05$);痂下肌肉组织细菌定量抗菌肽组(99 ± 32) $\times 10^2$ CFU/g 和磺胺米隆组(87 ± 31) $\times 10^2$ CFU/g,均显著低于对照组(504 ± 338) $\times 10^3$ CFU/g($P<0.01$);对照组伤后 3 d 存活率明显少于其他两组($P<0.05$)。结论:超声处理能诱导家蝇幼虫产生抗菌肽,其对阴沟肠杆菌感染的 ICR 小鼠创面有较强抗感染作用。

【关键词】家蝇;抗菌肽;超声诱导;伤口感染;阴沟肠杆菌

【中国图书分类法分类号】Q514.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-03

Antibacterial effect of the antibacterial peptide from housefly larvae on *Enterobacter cloacae* infected wound in mice

CHEN Man, et al

(*School of Laboratory Medicine, Chengdu College of Medicine*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the antibacterial effects of the antibacterial substances on *Enterobacter cloacae* infection of wound in mice. *Methods*: Antibacterial substances of the larvae of housefly were induced by ultrasonic treatment, and its antibacterial activity was investigated with inhibition experiment in vitro. Thirty ICR mice were enrolled in the study, and the *Enterobacter cloacae* infection model was reproduced by excision of the full layer of dorsal skin with an

作者介绍:陈 曼(1980-),女,硕士,研究方向:天然抗菌肽。

通讯作者:涂植光,男,教授,E-mail:tuzhiguang@yahoo.com.cn。

基金项目:国家自然科学基金项目(30472106)。

与其它因子或系统的相互作用奠定了基础。在随后的研究中我们也证实了该融合蛋白具有生物学活性。

(致谢:感谢美国芝加哥大学医学中心分子肿瘤研究室全体研究人员;感谢重庆医科大学生物原子工程系技术人员。)

参 考 文 献

[1] Gupta S, Hussain T, MacLennan G T, et al. Differential expression of S100A2 and S100A4 during progression of human prostate adenocarcinoma[J]. J Clin Oncol, 2003, 21(1): 106-112.

[2] Matsubara D, Niki T, Ishikawa S, et al. Differential expression of S100A2 and S100A4 in lung adenocarcinomas: clinicopathological significance, relationship to p53 and identification of their target genes[J]. Cancer Sci, 2005, 96(12): 844-857.

[3] Zhang X, Hunt J L, Shin D M, et al. Down-regulation of S100A2 in lymph node metastases of head and neck cancer[J]. Head Neck, 2007, 29(3): 236-243.

[4] Ok-Jae L, Seung-Mo H, Mohammad H R, et al. Expression of calcium-binding proteins S100A2 and S100A4 in barrett's adenocarcinomas[J]. Neoplasia, 2006, 8(10): 843-850.

[5] Imazawa M, Hibi K, Fujitake S, et al. S100A2 overexpression is frequently observed in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Anticancer Res, 2005, 25(2B): 1247-1250.

[6] Park H R, Min S K. Expression of S100A2 and S100B proteins *in epithelial tumors of the skin*[J]. J Cutan Patho, 2003, 30(6): 373-378.

[7] 苗静琨,赖天霞,左国伟,等.人 S100A6-GST 融合蛋白的原核表达和纯化[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(10): 1009-1012.

(责任编辑:冉明会)

area of 1 cm × 1 cm. Then they were randomly divided into group C (control, n=10, with wet compress of isotonic saline), group M (with hydropathic compress of 100 g/L mafenide) and group A (with wet compress of 0.1 g/L antibacterial peptide). The changes of white blood cell counts in each group were determined before and 3 days after injury. Bacterial growth in muscular tissue of the wounds and the survival of the mice were observed at 3 days after injury. *Results*: The purified peptide was highly potent against *Enterobacter cloacae* in vitro. The number of leucocytes in each group was decreased after operation, with significantly less number in group C than in group M and A. Bacterial growth in muscle demonstrated a difference between treated groups and group C at 3 days [group M: $(87 \pm 31) \times 10^2$ CFU/g; group A: $(99 \pm 32) \times 10^2$ CFU/g; group C: $(504 \pm 338) \times 10^3$ CFU/g] (P<0.01). The survival after 3 days in group C (60%) was evidently smaller than that in group A (90%) and M (90%) (P<0.05). *Conclusion*: The antibacterial peptide of housefly which is induced by ultrasonic treatment possesses obvious anti-bacterial effect on the *Enterobacter cloacae* infected wounds of ICR mice.

【Key words】 Housefly (*Musca domestica*); Antibacterial peptide; Ultrasonic induction; Wound infection; *Enterobacter cloacae*

抗菌肽是生物防御系统的一个重要组成部分，是生物体受到损伤或感染病菌的情况下产生的一类非专一性免疫应答物。研究证实了抗菌肽对细菌、病毒、真菌等都有较强的活性，其独特的杀菌机制对临床上一些常见的耐药性细菌也显示了良好的应用前景[1,2]。与传统抗生素相比，还有促进伤口愈合和免疫调节等作用[3]，从而引起广泛关注[4]，昆虫抗菌肽是最早发现的一类抗菌肽，在医药、农业、畜禽养殖业及食品工业中显示出广阔的应用前景。

家蝇生长在病菌丛生的环境中，表现出超强的适应恶劣环境的能力，说明它具有独特的防御机制。研究者常把蝇幼虫作为制备抗菌肽的重要工具，研究主要集中在抗菌肽的诱导和分离纯化，体外试验分析抑菌特性[5-7]，而对抗菌肽抗菌作用的动物实验较少。本文以家蝇 3 龄幼虫为原料，超声诱导其血淋巴产生抗菌活性物质，根据其特有的理化性质进行分离纯化和抗菌活性鉴定，研究其对阴沟肠杆菌感染的小鼠创面的抗菌作用。通过对小鼠痂下肌肉组织细菌定量及存活率的观察，与临床上阴沟肠杆菌感染传统用药相比，评价抗菌肽的功效，为进一步研究提供有益参考。

1 材料和方法

1.1 家蝇幼虫来源与供试菌株

家蝇 (*Musca domestica*) 由本实验室以人工配制饲料饲养，其幼虫养至 3 龄备用。阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)，革兰阴性杆菌，为本实验室保存。100 g/L 磺胺米隆溶液购于苏州苏瑞医药有限公司。健康雄性清洁级 ICR 小鼠 30 只购自北京维通利华实验动物技术有限公司，体重 (21 ± 2) g/只。

1.2 抗菌物质的诱导和粗提

将一定量的家蝇 3 d 龄幼虫放在盛有昆虫生理盐水的小烧杯中，置超声清洗器中 300 W，50 Hz 处理 60 s，放入新的饲料盅，在 25℃~30℃恒温房里继续饲养 48 h 后，沸水瞬时处死备用。液氮中研磨样品，将粉末转移到预冷的 2 倍体积的无离子水中 (含有 100 μg/ml PMSF，1 mmol/L 的 DTT)，置于 4℃下静置 20 min，离心 (15 000 g/min，4℃，45 min)，上清备用。

1.3 抗菌肽的纯化

将上述方法所得上清液直接加到经 0.05 mol/L 甲酸铵缓冲液 (pH7.36) 充分平衡的层析柱上 (5 cm × 1.6 cm)，先用 50 ml 起始缓冲液冲洗，然后用 500 ml 0.05~1 mol/L 的乙酸铵缓冲液 (pH5.1) 梯度洗脱，流速为 1 ml/min，按每管 5 ml 进行收集，在 280 nm 处测其光密度。各管取 1 ml 低温真空浓缩后用 0.15 mol/L 的氯化钠按原体积 100∶1 重溶，测定抑菌活性。

1.4 蛋白定量

用考马斯亮兰法制作标准曲线根据 595 nm 吸光度的变化测定抗菌肽含量。

1.5 制备 10^8 CFU/ml 阴沟肠杆菌菌悬液

用 LB 液体培养基增菌阴沟肠杆菌到对数期，2 000 g 离心 15 min，用 0.15 mol/L 的氯化钠清洗两次，通过 LB 琼脂平板系列稀释法，37℃孵育 24 h 后记数鉴定菌落数，配成浓度为 10^8 CFU/ml。

1.6 抑菌活性测定

采用平板法，参照全国临床检验操作规程[8]，略作改动。采用 LB 培养基代替 MH 培养基，配制浓度为 1×10^8 CFU/ml 的阴沟肠杆菌悬液接种到直径为 9 cm 的 LB 平板上。滤纸片的直径为 6 mm，每张纸片的加样量为 7 μl，贴上纸片后 37℃培养 1~3 d，通过测定抑菌圈直径定性检测抑菌活力。

1.7 阴沟肠杆菌感染模型的建立

健康雄性清洁级 ICR 小鼠 30 只，体重 (21 ± 2) g/只。造模前 1 d 用 80 g/L 硫化钠将小鼠背部拟手术区皮肤脱毛，手术前用乙醚麻醉，固定，在小鼠背部脊柱两侧，用手术刀切除 1 cm × 1 cm 的正方形全层皮肤及皮下组织，在创面上均匀涂

抹阴沟肠杆菌菌液 0.1 ml（1×10^8 CFU/ml），用无菌纱布包扎。

1.8 实验分组

采用随机数字表法将 30 只小鼠随机分为对照组、磺胺米隆组、抗菌肽组，每组 10 只，分笼饲养在清洁、干燥、室温为（25±2）℃的实验室内。伤后 2 h 各组创面分别用含等渗生理盐水、100 g/L 磺胺米隆溶液或 0.1 g/L 抗菌肽溶液的消毒无菌滤纸 4 层湿敷，再用无菌纱布包扎，每日换药 1 次。观察小鼠创面感染情况和精神状态，伤前和伤后 3 d 小鼠尾尖取血观察血象变化；对快死亡小鼠抽血做血培养，3 d 后计算小鼠的存活率。

1.9 痂下肌肉组织细菌定量检测

伤后第 3 d，颈椎脱臼法处死各组存活小鼠，在无菌操作下取痂下肌肉组织，称重，加入等渗盐水 1 ml，匀浆，通过系列稀释后接种在琼脂平板上，置于 37℃温箱中孵育 24 h 后，计数菌落数并计算每克组织的克隆形成单位，选择典型菌落进行鉴定。

1.10 数据分析统计学处理

计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，白细胞计数使用非参数检验 Mann-Whitney Test；细菌定量采用非参数检验 Wilcoxon Signed Ranks Test；存活率使用生存分析中的 Log-rank Kaplan-Meier 方法。SPSS15.0 统计软件进行分析，检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 抑菌试验结果和定量结果

有活性的样品抗菌肽浓度为 108 μg/ml，每张纸片含量 0.76 μg。对阴沟肠杆菌的抑菌圈直径为（22±2）mm，依据判定标准为敏感，说明抗菌中心为 30 μg 的阿米卡星阳性对照肽对阴沟肠杆菌有很强的抑制作用，结果见图1。



中心为 30 μg 的阿米卡星阳性对照

图 1 对阴沟肠杆菌的抑菌检测

2.2 对感染动物模型的影响

对照组小鼠相比其他两组活动减少，创面分泌物多；磺胺米隆组和抗菌肽组创面结痂，干燥，分泌物少。伤前白细胞为（9.65±1.87）$\times10^9$ 个 /L，伤后 3 d 白细胞计数均减少。对照组（3.36±0.45）$\times10^9$ 个 /L 明显少于磺胺米隆组（4.29±0.33）$\times10^9$ 个 /L 和抗菌肽组（4.13±0.26）$\times10^9$ 个 /L（均 $P<0.05$），后两组间无显著性差异（$P>0.05$），见表 1。3 d 后对照组小鼠存活 6 只，抗菌肽组小鼠存活 9 只，磺胺米隆组存活 9 只，存活率分别为 60%，90%和 90%，对照组明显小于其他两组（均 $P<0.05$），死亡鼠血培养结果均为阴沟肠杆菌。

2.3 痂下肌肉组织

细菌培养经形态，菌落及生化鉴定主要为阴沟肠肠菌。对照组阴沟肠杆菌定量（504±338）$\times10^3$ CFU/g，磺胺米隆组（87±31）$\times10^2$ CFU/g，抗菌肽组（99±32）$\times10^2$ CFU/g；后两组明显低于对照组（$P<0.01$），而抗菌肽组与磺胺米隆组无显著差别（$P>0.05$）。见表1。

3 讨 论

对烧伤创面感染传统的治疗方法是通过口服或静脉注射抗生素结合皮肤表面杀菌剂降低组织里的细菌数量。随着细菌耐药性变迁和更为严重的多重耐药菌的问题，抗生素的使用越来越受到限制。此外，抗生素在治疗的过程中还存在一些不利于伤口愈合的副作用。阴沟肠杆菌为条件致病菌，因高表达头孢菌素酶和 β-内酰胺酶等而具有较强耐药性。近年来发现阴沟肠杆菌院内感染率明显增强[9~11]，磺胺米隆是临床上常用的有效抗阴沟肠杆菌的外用药，不受脓液、坏死组织、对氨苯甲酸等的影响，常局部应用于烧伤感染及化脓创面。但它能引起创面疼痛刺激、抑制碳酸酐酶、抑制角质形成细胞增殖等影响创面愈合的不良作用。因此，临床上需要更理想的药物。

抗菌肽被证明对许多致病菌包括严重耐药的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌均有抗菌作用[12,13]，还能通过促进上皮细胞增殖和成纤维细胞有丝分裂[14]，促进胶原 mRNA 表达、降低基质金属蛋白酶的表达、增加细胞外基质的沉积和控制其降解等方式加速伤口愈合[3]。本研究通过超声处理诱导家蝇幼虫产生抗菌肽，初步纯化后，药物敏感试验证明其

表 1 伤后 3d 白细胞及痂下细菌计数

小鼠编号	白细胞计数（$\times 10^9$ 个/L）			细菌数(CFU/g)		
	对照组	磺胺米隆组	抗菌肽组	对照组（$\times 10^3$）	磺胺米隆组（$\times 10^2$）	抗菌肽组（$\times 10^2$）
1	3.85	3.90	3.95	342	98	124
2	3.15	4.25	—	893	64	—
3	2.65	4.10	4.65	945	121	69
4	—	4.45	4.30	—	145	83
5	3.72	4.21	4.11	258	73	134
6	3.20	4.93	4.05	134	82	101
7	—	3.91	3.95	—	68	57
8	3.60	4.62	3.75	453	91	74
9	—	—	4.25	—	—	95
10	—	4.31	4.22	—	45	154
$\bar{x} \pm s$	3.36 ± 0.45	4.29 ± 0.33*	4.13 ± 0.26*	504 ± 338	87 ± 31**	99 ± 32**

注：*$P<0.05$ 与对照组比；**$P<0.01$ 与对照组比

具有良好的体外抗菌效果，对阴沟肠杆菌敏感。对 ICR 小鼠阴沟肠杆菌感染模型的抗菌试验，通过对创面的观察以及感染后高峰期第 3 d 小鼠的白细胞及痂下细菌计数的统计分析，发现抗菌肽对阴沟肠杆菌感染的小鼠具有较好的治疗作用，显著提高了存活率，而与磺胺米隆组无明显差异。考虑到其他方面的潜能，抗菌肽不失为一个好的研究对象。

但抗菌肽作为蛋白质有其独特的理化性质和最适应用环境，当外源性应用时，伤口环境里的蛋白酶、电解质、pH 的变更是否减低抗菌肽的活力，影响抗菌肽的稳定性，值得进一步研究。

参 考 文 献

[1] Izadpanah A, Gallo R L. Antimicrobial peptides[J]. J Am Acad Derma. Tol, 2005, 52(3): 381-392.

[2] Cudic M, Condie BA, Weiner DJ, et al. Development of novel antibacterial peptides that kill resistant isolates[J]. Peptides, 2002, 23(12): 2071-2083.

[3] Oono T, Shirafugi Y, Huh WK, et al. Effects of human neutrophil peptide-1 on the expression of interstitial collagenase and type I collagen in human dermal fibroblaste[J]. Arch Dermatol Res, 2002, 294(4): 185-189.

[4] Yamakawa M. Insect antibacterial proteins: Regulatory mechanisms of their synthesis and a possibility as new antibiotics[J]. J Seric Sci, 1998, 67(3): 163-168.

[5] 国 果，吴建伟，付 萍，等. 家蝇幼虫分泌物抗菌肽的生化特性初步研究[J]. 昆虫学报，2006，49(6)：918-923.

[6] 周义文，尹一兵，涂植光，等. 家蝇抗菌肽抗菌活性及抗菌机制的初步研究[J]. 中国抗生素杂志，2004，29(5)：272-274.

[7] 陆 婕，汪俊汉，钟 雅，等. 弱酸性家蝇蛆抗菌肽 MD7095 的分离纯化及性质研究[J]. 微生物学报，2006，46(3)：406-411.

[8] 叶应妩，王毓三. 全国临床检验操作规程[M]. 第 3 版，南京：东南大学出版社，2006.896-912.

[9] 周 光，沈定霞，罗燕萍，等. 临床阴沟肠杆菌感染的分布与耐药特性研究[J]. 中华医院感染学杂志，2006，16(3)：340-342.

[10] 蔡培泉，王春新，过 毅，等. 阴沟肠杆菌质粒型 AmpC 酶基因的研究[J]. 中华医院感染学杂志，2006，16(4)：368-370.

[11] 夏成德，赵耀华，牛希华，等. 烧伤创面细菌学调查及耐药性分析[J]. 西南军医，2007，15(4)：339-342.

[12] Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity[J]. J Leukoc Biol, 2004, 75(1): 39-48.

[13] Gennaro R, Zanetti M. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides[J]. Biopolymers (Peptide Science), 2000, 55(1): 31-49.

[14] Tjabringa G S, Aarbiou J, Ninaber D K, et al. The antimicrobial peptide LL-37 activates innate immunity at the airway epithelial surface by transactivation of the epidermal growth factor receptor[J]. J Immunol, 2003, 171(12): 6690-6696.

（责任编辑：关蕴良）