乳铁蛋白多肽嵌合体对泛耐药铜绿假单胞菌毒力因子表达的影响*

徐国鹏，张 俐，叶辛幸
（南京医科大学附属苏州医院 呼吸内科，江苏 苏州 215002）

［摘 要］**目的**：研究乳铁蛋白多肽嵌合体对泛耐药铜绿假单胞菌绿脓菌素、弹性蛋白酶表达的影响。**方法**：在泛耐药铜绿假单胞菌培养基（D_{600} = 0.05）中分别加入乳铁蛋白多肽（LFampin、LFcin）以及乳铁蛋白多肽嵌合体（LFchimera）溶液干预，通过氯仿萃取法定量检测绿脓菌素水平，用刚果红弹性蛋白检测法检测弹性蛋白酶活性。**结果**：LFampin、LFcin 以及 LFchimer 均对泛耐药铜绿假单胞菌有杀菌活性，且能显著抑制绿脓菌素、弹性蛋白酶的表达，其作用与浓度呈正相关，其中，LFchimera 的作用强于 LFampin 及 LFcin，差异有统计学意义（$P < 0.05$）。**结论**：乳铁蛋白多肽，尤其是乳铁蛋白多肽嵌合体对泛耐药铜绿假单胞菌具有良好的抗菌活性，能显著抑制其绿脓菌素、弹性蛋白酶的表达。

［关键词］假单胞菌，铜绿；感染；耐药；乳铁蛋白多肽嵌合体；绿脓菌素；弹性蛋白酶
［中图分类号］R378 ［文献标识码］A ［文章编号］1000-2707（2014）04-0556-04

Effects of Lactoferrin Polypeptide Chimera on the Expression of Virulence Factors in Pan Drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

XU Guopeng, ZHANG Li, YE Xinxing
(*Department of Respiratory Medicine, the Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University, Suzhou 215002, Jiangsu, China*)

［**Abstract**］**Objective**: To study the effects of lactoferrin polypeptide chimera (LFchimera) on the expression of virulence factors in pan drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Methods**: The solutions of lactoferrin polypeptide (LFcin and LFampin), LFchimera and LFcin plus LFampin were added into the culture medium of pan drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, and quantitative detection of pyocyanine levels was performed by using chloroform extraction method, the elastase activity was measured by elastin congo red method. **Results**: LFampin, LFcin, and LFchimera showed the bactericidal activity against pan drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, and could inhibit pyocyanine expression and elastase activity. These effects were positively correlated with their concentrations, and the effects of LFchimera were stronger than those of LFampin, LFcin and their mixtures. **Conclusions**: Lactoferrin polypeptide, especially LFchimera have good antibacterial activity against pan drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, and can inhibit pyocyanine expression and elastase activity.

［**Key words**］*Pseudomonas aeruginosa*; infection; drug-resistant; lactoferrin polypeptide chimera; pyocyanine; elastase

铜绿假单胞菌，是临床最常见的机会致病菌之一，是医院感染，例如医院获得性肺炎、呼吸机相关肺炎的主要病原体[1]。铜绿假单胞菌的致病性与其毒力因子有关[2]。弹性蛋白酶可以导致机体蛋白质的降解，破坏机体组织完整性，而绿脓菌素则可以抑制纤毛运动、细胞呼吸、促进表皮细胞生长和前列环素释放，破坏钙稳态[3-4]。随着抗生素在临床的广泛使用，铜绿假单胞菌泛耐药致病菌株的大量出现使得临床迫切需要寻找新的有效的抗菌药。乳铁蛋白（LF）是一种具有广谱抗细菌、真菌、原生动物和病毒的多功能铁螯合蛋白，乳铁蛋白多肽 LFampin 和 LFcin 则是 LF 经胃蛋白酶水解产生

*［基金项目］江苏省苏州市科技计划基金（SYS201150）
网络出版时间：2014 - 08 - 14 网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20140814.2247.075.html

的小分子片段,具有比其母分子 LF 更强的杀菌活性,而由 LFampin 和 LFci 连接合成的小分子乳铁蛋白多肽嵌合体(LFchimera)具有比 LFampin 和 LFcin 本身更强的杀菌活性[5-8]。目前乳铁蛋白多肽嵌合体对泛耐药铜绿假单胞菌杀菌活性及毒力因子表达的作用尚不明确,本研究比较了乳铁蛋白多肽和乳铁蛋白多肽嵌合体对泛耐药铜绿假单胞菌杀菌活性以及对绿脓菌素、弹性蛋白酶表达的影响,探讨乳铁蛋白多肽嵌合体用于治疗泛耐药铜绿假单胞菌感染的可能性。

1　材料与方法

1.1　材料和试剂

1.1.1　菌株和培养基　泛耐药铜绿假单胞菌(PDR-PA)为南京医科大学附属苏州医院检验科微生物室临床菌株。PDR-PA 在 LB 培养基中培养。绿脓菌素、弹性蛋白酶检测所用培养基分别为 PB 培养基和 PTSB 培养基。

1.1.2　多肽　乳铁蛋白多肽以及乳铁蛋白多肽嵌合体由上海科肽生物科技有限公司合成,纯度 > 90%。本实验所用多肽一级结构如表 1 所示。

表 1　乳铁蛋白多肽的一级结构

Tab. 1　The primary structure of lactoferrin polypeptide

多肽	氨基酸序列
LFampin (268 – 284)	WKLLSKAQEKFGKNKSR
LFcin (17 – 30)	FKCRRWQWRMKKLG
LFchimera	WKLLSKAQEKFGKNKSR-K-GLKKMRWQWRRCKF

1.1.3　主要试剂　LB 固体培养基(氯化钠 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、胰蛋白胨 10 g/L、琼脂 12 g/L);LB 液体培养基(氯化钠 5 g/L、酵母提取物 5 g/L、胰蛋白胨 10 g/L);PTSB 培养基(蛋白胨 50 g/L、胰酶大豆肉汤 1 g/L);PB 培养基(细菌蛋白胨 20 g/L、硫酸钾 10 g/L、氯化镁 1.4 g/L);PBS 缓冲液(氯化钠 8 g/L、磷酸氢二钠 1.44 g/L、氯化钾 0.2 g/L、磷酸二氢钾 0.24 g/L、超纯水 800 mL、HCl 调节 pH 7.4,加超纯水定容至 1 L);1 mmol/L 磷酸钾缓冲液(磷酸氢二钾 0.140 g/L、磷酸二氢钾 0.052 g/L);EDTA 终止液[乙二胺四乙酸钠盐($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$) 44.66 g/L];弹性蛋白酶反应缓冲液[1 mmol/L 氯化钙、10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.2)]。

1.1.4　主要仪器和器材　Universal 32R 离心机、Centrifuge 5810R 离心机、Elx800 酶标仪、Sunrise 酶标仪、DU-640 型紫外分光光度计。

1.2　活菌检测

活菌检测采用平板计数法[7]。取冻存 PDR-PA 菌株复苏、培养、孵育,然后挑单克隆接种于新鲜 LB 培养基,37 ℃震荡培养过夜,洗涤、悬浮,继续培养至对数生长期,用新鲜 LB 培养基稀释至 D_{600} 为 0.05;在 96 孔 U 型底 PVC 培养板中加入以倍比稀释的乳铁蛋白多肽和多肽嵌合体溶液 50 μL,使其终浓度从 200 μmol/L 开始直至 6.25 μmol/L,加入到每一孔,每浓度 3 孔,用 PPB 溶液干预组为对照组;在 PVC 培养板每孔中加入 D_{600} 为 0.05 PDR-PA 细菌悬液 50 μL,37 ℃下孵育 1 h;细菌悬液用 PBS 溶液倍比稀释后接种于血液琼脂平板,37 ℃孵育 24 h,计数平板菌落数。乳铁蛋白多肽的杀菌活性为各组菌落计数与对照组菌落计数的比值(%)。

1.3　绿脓菌素定量检测

通过氯仿萃取法定量检测绿脓菌素[9]。挑取单克隆铜绿假单胞菌培养同上,培养至对数生长期,悬浮至 D_{600} 为 0.05;分别将乳铁蛋白多肽以及乳铁蛋白多肽嵌合体溶液加入到 5 mL 细菌悬液,使其终浓度为 1 及 25 μmol/L。置于 37 ℃恒温培养箱以 200 r/min 振荡孵育 24 h。在洁净无菌 96 孔板分别加入等量细菌悬液 200 μL,使用酶标仪检测 D_{600}。剩余细菌悬液经高速离心 20 min,吸取上清 2.5 mL 转入另一洁净试管,加入 1.5 mL 氯仿萃取后取氯仿层(下层),再加入 0.2 mol/L HCl 0.5 mL 萃取,取上层红色水相 100 μL,使用 Beckman DU-640 检测 D_{520}。绿脓菌素浓度计算公式为:$(mg/L \cdot D_{600}) = D_{520} \times 17.07 / D_{600}$[9]。

1.4　弹性蛋白酶活性检测

用刚果红弹性蛋白检测法检测弹性蛋白酶活性[10]。挑取单克隆铜绿假单胞菌培养同上,培养至对数生长期,悬浮至 D_{600} 为 0.05;分别将乳铁蛋白多肽以及乳铁蛋白多肽嵌合体溶液加入到 5 mL 细菌悬液,使其终浓度为 1 及 25 μmol/L。置于 37 ℃恒温培养箱以 200 r/min 振荡孵育 16 h;在洁净无菌 96 孔板分别加入等量细菌悬液 200 μL,酶标仪检测 D_{600};12 000 r/min 高速离心 20 min,取 100 μL 等量上清,加入玻璃管,然后加入刚果红弹性蛋白(Sigma)10 mg,和弹性蛋白酶缓冲溶液混合,200 r/min 振荡、37 ℃孵育 16 h,以无菌 PTSB 培养基加刚果红弹性蛋白为对照;然后在玻璃管中加入 100 μL 乙二胺四乙酸以终止反应,然后以 12 000 r/min 高速离心 20 min,取上清,去除底物,

测量上清 D_{495}；弹性蛋白酶活性表示为 D_{495}/D_{600}。

1.5 统计学方法

所有试验均重复 3 次，计量数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，$P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。使用 SPSS Statistics 17.0 软件处理实验数据。

2 结果

2.1 杀菌活性

不同浓度 LFampin、LFcin、两者的混合溶液及 LFchimera 与对 PDR-PA 的杀菌活性见表 2。数据显示，随着 LFampin、LFcin、两者的混合溶液及 LFchimera 浓度增高对 PDR-PA 的杀菌活性亦增强，各浓度之间比较差异有统计学意义（$P < 0.05$）。其中，尤以 LFchimera 的杀菌作用最强，其杀菌活性甚至强于 LFampin 及 LFcin 混合物。

2.2 PDR-PA 绿脓菌素合成

LFampin、LFcin 和 LFchimera 可以有效减少 PDR-PA 的色素聚集，结果如表 3 所示。LFampin、LFcin 和 LFchimera 极大抑制了泛耐药铜绿假单胞菌合成绿脓菌素，其中加入 LFchimera 的 PDR-PA 上清中绿脓菌素的浓度低于另外 3 组。

2.3 PDR-PA 弹性蛋白酶活性

将不同浓度的 LFampin、LFcin 及 LFchimera 加入到 PDR-PA 生长培养基中，可导致弹性蛋白酶活性减少（见表 4），LFchimera 对 PDR-PA 弹性蛋白酶的活性抑制最大。

表 2 乳铁蛋白多肽对 PDR-PA 的杀菌活性（$\bar{x} \pm s$）

Tab. 2 Bactericidal activity of lactoferrin polypeptide to PDR-PA

乳铁蛋白多肽浓度	杀菌活性			
（μmol/L）	LFampin	LFcin	LFcin + LFampin	LFchimera
3.13	63.34 ± 1.42	43.71 ± 2.10	31.10 ± 1.03	12.57 ± 0.96(1)
6.25	45.56 ± 1.68	31.41 ± 1.50	23.98 ± 1.25	4.21 ± 1.31(1)
12.50	32.97 ± 1.54	25.03 ± 1.34	13.11 ± 1.40	0.42 ± 0.16(1)
25.00	25.69 ± 1.41	15.71 ± 1.12	3.75 ± 1.17	0.09 ± 0.053(1)
50.00	15.17 ± 1.31	3.59 ± 1.37	0.35 ± 0.21	0.02 ± 0.04(1)
100.00	4.57 ± 1.86	0.47 ± 0.21	0.01 ± 0.01	0 ± 0(1)

(1) 与相同浓度其他各组比较，$P < 0.05$

表 3 乳铁蛋白多肽对绿脓菌素表达的作用（mg/L · D_{600}）

Tab. 3 The effects of lactoferrin polypeptide on pyocyanin expression

乳铁蛋白多肽浓度	绿脓菌素表达				
（μmol/L）	LFampin	LFcin	LFcin + LFampin	LFchimera	Control
1	16.73 ± 0.88(1)	12.93 ± 042(1)	7.86 ± 0.39(1)	3.75 ± 0.47(1)(2)	22.30 ± 1.41
25	14.06 ± 0.54(1)	10.92 ± 0.32(1)	3.31 ± 0.18(1)	0.97 ± 0.12(1)(2)	22.30 ± 1.41

(1) 与对照组比较，$P < 0.05$；(2) 与相同浓度其他各组比较，$P < 0.05$

表 4 乳铁蛋白多肽对弹性蛋白酶活性的作用（$\bar{x} \pm s$）

Tab. 4 The effects of lactoferrin polypeptide on elastase activity

乳铁蛋白多肽浓度	弹性蛋白酶活性				
（μmol/L）	LFampin	LFcin	LFcin + LFampin	LFchimera	Control
1	0.141 ± 0.005(1)	0.122 ± 0.009(1)	0.108 ± 0.004(1)	0.047 ± 0.002(1)(2)	0.152 ± 0.012
25	0.093 ± 0.007(1)	0.071 ± 0.004(1)	0.051 ± 0.004(1)	0.019 ± 0.002(1)(2)	0.152 ± 0.012

(1) 与对照组比较，$P < 0.05$；(2) 与相同浓度其他各组比较，$P < 0.05$

3 讨论

乳铁蛋白是一种生理活性与其 N 端阳离子区域有关的多功能铁糖蛋白，具有广谱的抗细菌、真菌、原生动物和病毒活性[5,11]。LFcin 和 LFampin 是水解牛乳铁蛋白 N 端区域获得的，是具有抗多种细菌活性的抗菌肽，这两种多肽的抗菌活性与其 N 端的两性螺旋有关[6-7,12]。近年的研究发现，利用赖氨酸将这 2 个抗菌肽连接到一起形成新的多肽分子对铜绿假单胞菌、大肠埃希菌和霍乱弧菌竟然具有比构成它的 LFcin 和 LFampin 混合物更强的杀菌活性[8,13]。前期研究显示，乳铁蛋白多肽嵌合体对铜绿假单胞菌标准株具有杀菌活性并可

抑制毒力因子表达,但是对泛耐药铜绿假单胞菌的杀菌活性及对毒力因子表达的作用尚不明确[14]。

乳铁蛋白多肽能够与带负电荷的细胞膜相互作用,可以分散细胞膜的组成分子脂多糖(LPS)进而改变膜通透性,从而导致病原体的死亡[12, 15];同时,LFchimera 的杀菌活性似乎不受高离子强度的干扰[8]。本研究显示, LFcin、LFampin 和 LFchimera 均对泛耐药铜绿假单胞菌有明显杀菌活性,而且 LFchimera 比乳铁蛋白多肽及其混合物具有更强的杀菌活性。绿脓菌素是耐药铜绿假单胞菌的一种毒力因子,它是最重要的有色次级代谢产物之一[2, 16]。弹性蛋白酶是耐药铜绿假单胞菌有效的毒力因子[17]。本研究显示 LFcin、LFampin 和 LFchimera 可以显著抑制泛耐药铜绿假单胞菌合成绿脓菌素和弹性蛋白酶,LFchimera 的抑制作用明显强于 LFcin、LFampin 及其混合物。

密度感知系统是一种调节细菌毒力因子表达的小分子信号系统,依赖于细胞密度。绿脓菌素的合成则由密度感知系统调控[4]。研究表明 lasR 基因是泛耐药铜绿假单胞菌弹性蛋白酶结构基因表达的正向转录调节子[18]。因此,推测乳铁蛋白多肽和多肽嵌合体抑制绿脓菌素和弹性蛋白酶合成的机制可能与密度感知系统基因调节有关。

本研究证实,乳铁蛋白多肽和多肽嵌合体不仅对泛耐药铜绿假单胞菌具有较强的杀菌作用;而且可以显著抑制其毒力因子绿脓菌素和弹性蛋白酶的表达,其中乳铁蛋白嵌合体的抑制作用更显著,有望用于治疗临床日益常见的泛耐药菌铜绿假单胞感染。

4　参考文献

[1] Rosenthal VD, Bijie H, Maki DG, et al. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 36 countries, for 2004 – 2009 [J]. Am J Infect Control, 2012(5):396 – 407.

[2] Pereira SG, Rosa AC, Ferreira AS, et al. Virulence factors and infection ability of Pseudomonas aeruginosa isolates from a hydropathic facility and respiratory infections [J]. J Appl Microbiol, 2014(5):1359 – 1368.

[3] Wang H, Tu F, Gui Z . Virulence factors in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and modes of regulation [J]. Indian J Microbiol, 2013(2):163 – 167.

[4] Rada B, Leto TL. Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in Pseudomonas aeruginosa airway infections [J]. Trends Mol Med, 2013(2): 73 – 81.

[5] Haney EF, Nazmi K, Bolscher JG, et al. Structural and biophysical characterization of an antimicrobial peptide chimera comprised of lactoferricin and lactoferrampin [J]. Biochim Biophys Acta, 2012 (3):762 – 775.

[6] Bolscher J, Nazmi K, van Marle J, et al. Chimerization of lactoferricin and lactoferrampin peptides strongly potentiates the killing activity against Candida albicans [J]. J Biochem Cell Biol, 2012 (3):378 – 388.

[7] Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, et al. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin [J]. Biochim Biophys Acta, 1992(1 – 2): 130 – 136.

[8] Bolscher JG, Adão R, Nazmi K, et al. Bactericidal activity of LFchimera is stronger and less sensitive to ionic strength than its constituent lactoferricin and lactoferrampin peptides [J]. Biochimie, 2009(1): 123 – 132.

[9] Essar DW, Eberly L, Hadero A, et al. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in Pseudomonas aeruginosa: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications [J]. J Bacteriol, 1990(2): 884 – 900.

[10] Pinna A, Usai D, Sechi LA, et al. Detection of virulence factors in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from contact lens-associated corneal ulcers [J]. Cornea, 2008 (3):320 – 326.

[11] Del Olmo A, Morales P, Nuñez M. Bactericidal activity of lactoferrin and its amidated and pepsin-digested derivatives against Pseudomonas fluorescens in ground beef and meat fractions [J]. J Food Prot, 2009 (4):760 – 765.

[12] Flores-Villaseñor H, Canizalez-Román A, Reyes-Lopez M, et al. Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFcin, LFampin and LFchimera on antibiotic-resistant Staphylococcus aureus and Escherichia coli [J]. Biometals, 2010 (3):569 – 578.

[13] Leon-Sicairos N, Canizalez-Roman A, de la Garza M, et al. Bactericidal effect of lactoferrin and lactoferrin chimera against halophilic Vibrio parahaemolyticus [J]. Biochimie, 2009(1):133 – 140.

[14] Xu G, Xiong W, Hu Q, et al. Lactoferrin-derived peptides and Lactoferricin chimera inhibit virulence factor production and biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa[J]. J Appl Microbiol, 2010 (4):1311 – 1118.

[15] Yen CC, Shen CJ, Hsu WH, et al. Lactoferrin: an iron-binding antimicrobial protein against Escherichia coli infection [J]. Biometals, 2011(4):585 – 594.

[16] Dietrich LE, Price-Whelan A, Petersen A, et al. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of Pseudomonas aeruginosa [J]. Mol Microbiol, 2006(5): 1308 – 1321.

[17] Pandeeti EV, Pitchika GK, Jotshi J, et al. Enzymatic depilation of animal hide: identification of elastase (LasB) from Pseudomonas aeruginosa MCM B-327 as a depilating protease [J]. PLoS One, 2011 (2):16742.

[18] Longo F, Rampioni G, Bondì R, et al. A new transcriptional repressor of the pseudomonas aeruginosa quorum sensing receptor gene lasR [J]. PLoS One, 2013(7): 69554.

(2014-05-23 收稿,2014-06-30 修回)
中文编辑: 周　凌; 英文编辑: 周　凌