



论 文

蜂毒肽抑杀病原菌的超微结构观察

王关林, 那杰, 潘凌子, 邢卓, 方宏筠

辽宁师范大学生命科学学院, 大连 116029

E-mail: guanlinwang@163.com

收稿日期: 2009-01-23; 接受日期: 2009-03-02

国家自然科学基金(批准号: 30270893)和国家自然科学基金国际合作基金项目(批准号: 30310103130)资助

摘要 本研究比较了蜂毒肽对 4 种不同病原菌生长的影响及其抑杀菌作用的差异, 并利用电子显微镜观察了蜂毒肽抑杀菌过程中超微结构的变化. 结果表明, 蜂毒肽对白菜软腐病菌的杀菌作用最强, 而且速效; 对酵母菌和番茄叶霉病菌孢子同样具有很强的杀灭作用, 但作用时间延长; 对金黄色葡萄球菌为低浓度抑菌, 高浓度杀菌作用. 实验中观察到, 蜂毒肽在抑杀菌过程中超微结构的变化有 3 种方式致死细胞: 一是膜孔洞式, 即蜂毒肽作用后在细胞膜区形成小空泡, 随之由内向外扩展穿透细胞壁形成孔洞, 引起菌体内容物泄漏死亡, 显示了膜孔洞的形成过程; 二是质壁分离式, 小空泡以横向扩展使细胞产生类似质壁分离样空腔, 最后细胞裂解死亡; 三是细胞质空腔式, 蜂毒肽进入细胞后与细胞质中的类膜系统的膜结合引起解体, 细胞质固缩, 出现空腔, 细胞死亡. 值得注意的是蜂毒肽抑杀菌作用的强弱及速效性与其不同杀菌方式相关. 综上所述, 蜂毒肽各种抑杀菌方式的共同点是蜂毒肽与膜磷脂分子结合相互作用所致.

关键词蜂毒肽
超微结构
病原菌
机理

抗菌肽是瑞典科学家 Boman 等人^[1]从天蚕蛹中发现的一种具有抗菌活性的小分子多肽, 并定名为抗菌肽(cecropins). 近年来药物学家认为抗菌肽是未来研制不易产生耐药性抗生素的候选者^[2]. 关于抗菌肽抑杀菌机理已有一定的研究工作, Benachir^[3]提出了“全或无”的观点, 认为细胞质渗漏可能是使膜的透性增加, 而不是在膜上形成一个个完整的孔洞; Matsuzak 等人^[4~8]生化研究结果表明, 抗菌肽通过与膜磷脂分子结合而形成孔洞; Zasloff^[9]归纳了抗菌肽抑杀菌作用机理的 5 种假说. 上述机理研究都以蚕抗菌肽为实验材料, 而针对其他种类抗菌肽的研究甚少.

蜂毒肽是一种杀菌作用最强的昆虫抗菌肽之一, 此前在蜂毒肽药物研究中发现, 蜂毒肽不仅对医学病原菌有抑杀作用, 而且对农作物病原菌均有抑杀作用, 并具有广谱、速效、高效等特点, 显示了其作为生物农药的应用潜力^[9]. 作者已从事多年蜂毒肽基因工程生物农药的研究工作^[10~13]. 细胞超微结构的

观察是研究抗菌肽杀菌机理不可缺少的直接证据. 本文试图研究蜂毒肽抑杀农作物病原菌过程中, 菌体细胞超微结构变化, 比较细菌、酵母菌和真菌等不同菌种的差异, 为阐明抗菌肽杀菌机理提供依据, 同时也为研制蜂毒肽生物农药打下理论基础.

1 材料和方法

1.1 实验材料

(1) 菌株. 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 由中国医学菌种保藏中心提供, 酵母菌 GS115 由大连 TaKaRa 生物公司提供, 农作物病原菌白菜软腐病菌 (*Erwinia carotovora*), 番茄叶霉病菌 (*Fulvia fulva*) 由中国农业科学院及沈阳农业大学提供.

(2) 试剂. 蜂毒肽购自大连医药公司(由大连白云山制药厂生产, 药准字 000568 号), 针剂注射液, 单位 0.25 mg/mL, 并将蜂毒肽注射液冷冻干燥制成粉末, 低温保存, 再用 0.09% NaCl 配制成不同浓度

组合.

1.2 实验方法

(1) 生长曲线的绘制. 实验分成对照组和加药组, 对照组为不加蜂毒肽的 4 mL LB 液体培养基, 加药组中加入蜂毒肽浓度为 0.125 mg/mL 的相同培养基. 两组均分别加入已培养至对数生长期的白菜软腐病菌、金黄色葡萄球菌、酵母菌及番茄叶霉孢子菌液各 0.4 mL. 两组于试管中同步振荡培养 0, 1, 2, 4, 8 和 12 h 后分别检测各菌株的 A_{600} 值, 并统计分析杀菌率[杀菌率=(0 h 的 A_{600} 值-x h 的 A_{600} 值)/0 h 的 A_{600} 值 $\times 100\%$]. 上述实验均重复 3 次, 各数据均为平均值. 数据用 SPSS(10.0)统计软件进行分析和比较, 以平均数 $\pm$ 标准误差表示($\bar{x} \pm SE$).

(2) 样品的制备. 每种病原菌分别取 0.4 mL 培养至对数生长期的菌液加入到含 0.125 和 0.25 mg/mL 蜂毒肽的新配制 LB 液体培养基中, 振荡培养 1, 4, 8 和 12 h 后取样, 离心收集菌体, 供电子显微镜制样, 并设置对照组.

(3) 扫描电子显微镜样品的制备. 将浓缩的菌液涂布在盖玻片上, 经戊二醛固定, 乙醇逐级脱水处理. 在处理好的样品玻片表面喷金备用^[13].

(4) 透射电子显微镜超薄切片的制备. 按文献^[14]制备超薄切片.

2 结果与分析

2.1 蜂毒肽对不同菌种抑杀作用比较

实验中观察到对照组的 4 种病原菌培养 24 h 后均呈现正常生长曲线, 加药组各菌种都不能形成正

常的生长曲线, 表现出药物对菌株的抑杀作用. 为比较不同菌种对蜂毒肽作用的敏感性, 实验测试了蜂毒肽作用后对各菌种培养液 A_{600} 值的变化, 并计算抑杀菌率. 从图 1 可见, (i) 白菜软腐病菌加入蜂毒肽培养 1 h 后, 其 A 值从 0.24 下降至 0.01, 抑杀菌率为 95.8%, 12 h 后 A 值保持在 0.01(可能是菌体残渣所致, 实际杀菌率为 100%); (ii) 金黄色葡萄球菌培养 1 h 后 A 值为 0.10, 抑杀菌率为 50.5%, 4 h 后 A 值为 0.04, 抑杀菌率为 85.1%, 但 8 h 后 A 值为 0.07, 呈上升趋势, 抑杀菌率减少到 60.3%, 12 h 后杀菌率为 0, 表现了细菌恢复其生长状态. 这表明, 在该低浓度蜂毒肽下只是抑菌作用, 但当加入的蜂毒肽浓度提高一倍时, 则无恢复生长现象, 杀菌率 95% 以上; (iii) 酵母菌培养 1 h 后抑杀菌率 25.2%, 4 h 后 50.5%, 8 h 后为 92.2%, 无恢复现象; (iv) 番茄叶霉病菌孢子培养 1 h 后抑杀菌率为 19.4%, 4 h 后为 46.6%, 12 h 后为 94.1%, 24 h 后亦无恢复现象.

由此可见, 蜂毒肽对白菜软腐病菌的杀菌作用强而速效, 对金黄色葡萄球菌作用较快, 但低浓度表现为抑菌作用, 其杀菌浓度高于其他菌种, 酵母菌和番茄叶霉病菌孢子均能被杀灭, 无恢复现象, 但作用时间较长.

2.2 蜂毒肽抑杀细菌的超微结构变化

(1) 蜂毒肽抑杀白菜软腐菌的超微结构变化. 白菜软腐病菌是十字花科蔬菜四大病害之一腐烂病的病原菌. 透射电子显微镜观察可见(图 2(A)~(C)), 菌体经蜂毒肽作用 1 h 后, 在细胞膜区出现直径约 30 nm 的小空泡(箭头), 并由内向外扩展呈喇叭口形,

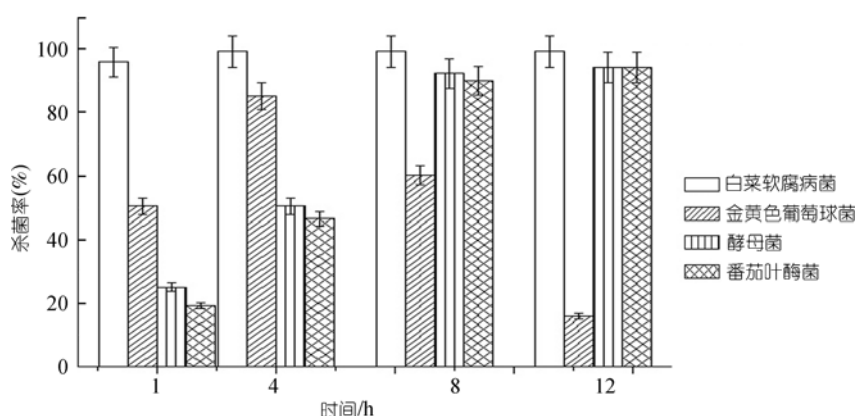


图 1 蜂毒肽对 4 种菌的杀菌率比较

在胞质内侧直径约 70 nm, 外侧直径约 30 nm, 并逐渐扩大, 贯穿细胞壁, 形成直径约 70 nm 边缘清晰的圆柱状孔洞(图 2(B)和(C)). 但此时菌体细胞质中的类膜系统仍然比较完整, 充满整个细胞. 随作用时间延长细胞内的类膜结构逐渐减少、呈降解状态(图 2(C)). 当作用 8 h 后细胞形态存在, 膜上孔洞扩展裂开, 细胞壁瓦解, 细胞内容物泄漏(箭头), 菌体崩解, 而且在细胞外介质中充满外泄的结构残体(图 2(A)).

扫描电子显微镜下观察到正常的白菜软腐病菌细胞表面光滑, 菌体饱满, 呈两端钝圆的长杆状(图 4(A)). 在蜂毒肽作用 1 h 后, 菌体开始变形, 表面粗糙凹陷, 有洞形小孔和裂口(箭头), 而后细胞破裂解体, 细胞质及内容物外泄, 镜下可观察到许多细菌裂解死亡后的残体. 菌体被包埋在溢出的胞浆中, 表面折光率明显下降(图 4(B)).

(2) 蜂毒肽抑杀金黄色葡萄球菌的超微结构变

化. 研究以常规人体致病菌金黄色葡萄球菌为比较试材. 正常的金黄色葡萄球菌菌体饱满近圆形, 表面光滑, 细胞质分布均匀(图 3(A)). 蜂毒肽作用 1 h 后, 位于细胞膜区出现一些小的空泡, 相邻排列, 随后逐渐呈横向扩散, 最后在细胞壁与细胞质之间形成环绕式空腔, 类似于质壁分离形态, 但实际上是细胞膜全部被降解所致(图 3(B)和(C)). 经蜂毒肽作用 8 h 后, 金黄色葡萄球菌细胞质收缩, 质壁分离状态加剧, 空腔增大, 细胞质内出现许多个空腔, 菌体死亡(图 3(C)), 但在细胞壁上未出现像白菜软腐菌那样的孔洞.

扫描电子显微镜下观察可见正常的金黄色葡萄球菌细胞呈圆球形, 表面光滑, 大小均一. 在蜂毒肽作用 1h 后菌体变形, 大小不均, 但菌体表面仍光滑平整. 有的菌体膨大肿胀, 并出现多个细胞黏合现象. 菌体周围未出现像白菜软腐病菌那样有些多细胞破裂的外泄物和细胞残体(图 5(A)和(B)).

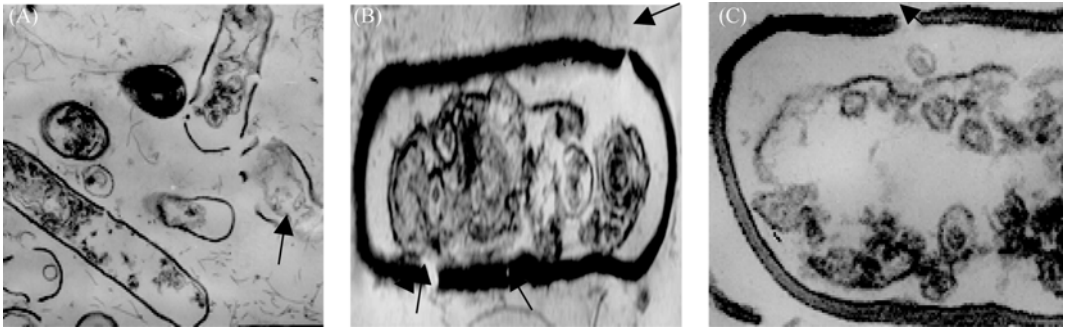


图 2 透射电子显微镜下白菜软腐病菌的形态结构

(A) 蜂毒肽作用 1 h 后的白菜软腐病菌($\times 8000$); (B) 蜂毒肽作用 1 h 后的白菜软腐病菌($\times 300000$);
(C) 蜂毒肽作用 4 h 后的白菜软腐病菌($\times 500000$)

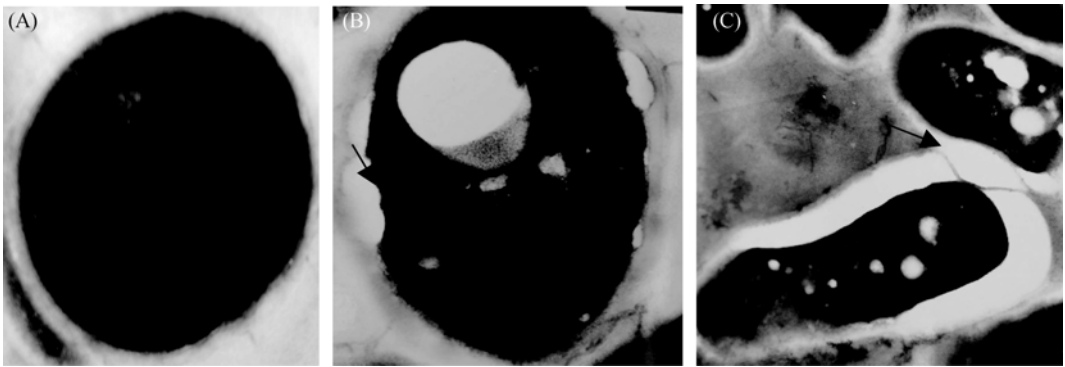


图 3 透射电子显微镜下金黄色葡萄球菌的形态结构

(A) 正常的金黄色葡萄球菌($\times 20000$); (B) 蜂毒肽作用 1 h 后的金黄色葡萄球菌($\times 20000$);
(C) 蜂毒肽作用 4 h 后的金黄色葡萄球菌($\times 10000$)

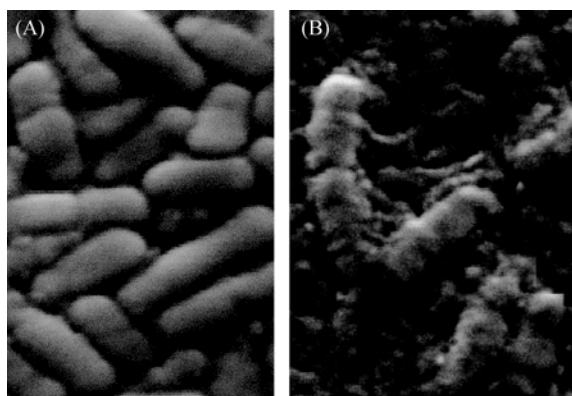


图 4 扫描电子显微镜下白菜软腐菌的形态结构

(A) 正常的白菜软腐菌($\times 10000$); (B) 蜂毒肽作用 1 h 后的白菜软腐菌($\times 10000$)

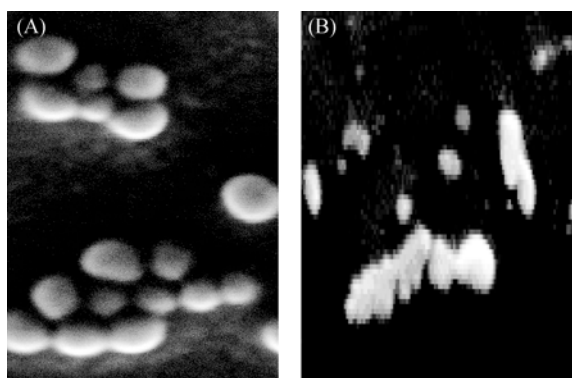


图 5 扫描电子显微镜下金黄色葡萄球菌的形态结构

(A) 正常金黄色葡萄球菌 ($\times 10000$); (B) 蜂毒肽作用 1 h 后的金黄色葡萄球菌($\times 10000$)

2.3 蜂毒肽抑杀酵母菌的超微结构变化

研究以酵母菌为真核细胞的典型试材. 透射电子显微镜下可见酵母菌细胞膜、细胞壁平滑、完整, 细胞结构规则致密, 细胞内容物分布均匀(图 6(A)). 蜂毒肽作用 1 h 后, 细胞膜上出现微小孔洞(图 6(B) 箭头), 4 h 后孔洞由内向外穿破细胞壁, 向内外扩张造成细胞质喷流外泄(图 6(C)), 细胞内出现空腔, 菌体裂解死亡(图 6(D)).

扫描电子显微镜下同样观察到正常的酵母菌近圆形, 细胞表面光滑, 菌体饱满(图 7(A)). 经蜂毒肽一直作用 8 h 后, 菌体表面粗糙, 呈现凹凸不平, 镜下可见酵母菌表面凹陷的井口样孔洞(箭头), 内容物外泄, 菌体死亡(图 7(B)).

2.4 蜂毒肽抑杀番茄叶霉病菌(*Fulvia fulva*)孢子的超微结构变化

透射电子显微镜观察可见, 正常的番茄叶霉病菌孢子切面近圆形, 非常规则, 细胞壁厚, 并且外被脊状突起, 细胞质分布均匀有序, 充满网状的结构(图 8 (A)). 蜂毒肽作用 24 h 后, 孢子皱缩变形, 细胞质固缩, 出现空腔, 质壁分离, 细胞质浓缩成团块状, 内部结构消失, 细胞壁破裂, 细胞质泄露而死亡, 外表面脊状突起也被降解 (图 8(B)).

扫描电子显微镜下, 对照组的番茄叶霉病菌孢子结构完整, 形状规则, 表面脊状颗粒有序分布(图 9(A)); 但蜂毒肽作用 24 h 后, 菌体形态改变严重, 呈

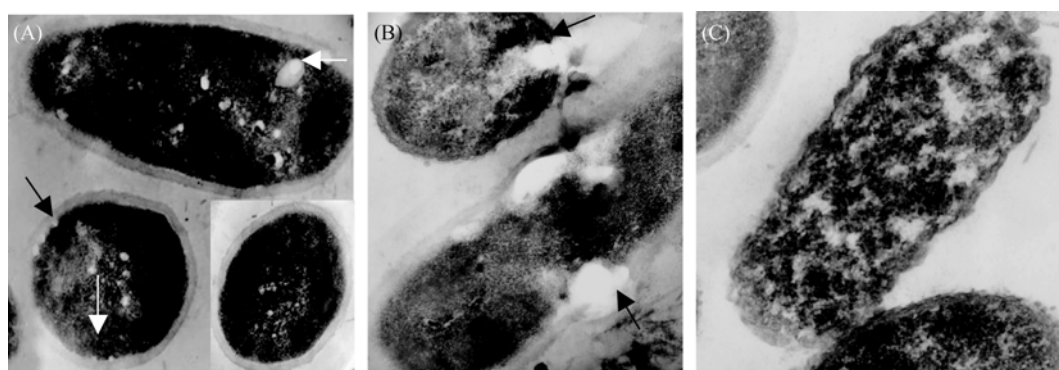


图 6 透射电子显微镜下酵母菌的形态结构

(A) 正常的酵母菌 ($\times 6000$); (B) 蜂毒肽作用 1 h 后的酵母菌($\times 10000$); (C) 蜂毒肽作用 4 h 后的酵母菌($\times 10000$); (D) 蜂毒肽作用 8 h 后的酵母菌($\times 10000$)

不规则状, 外表的脊状颗粒消失, 细胞壁出现凹陷样孔洞或裂缝(箭头), 细胞内容物外泄, 致使孢子表面皱缩死亡(图 9(B)).

3 讨论

3.1 蜂毒肽膜打孔假说的分析

在抗菌肽杀菌机理的 5 种假说中, 膜打孔假说受到多数生物化学研究者的支持, 但迄今膜孔形成过

程的细胞超微结构证据甚少^[4]. 本文通过透射和扫描电子显微镜实体观察到经蜂毒肽作用后, 细胞膜区出现 30 nm 小空泡, 接着由内向外穿透细胞壁形成 70 nm 孔洞, 并逐渐扩大造成细胞质外流, 菌体裂解死亡的过程. 这一现象显示了膜孔洞的形成过程, 进一步证实了抗菌肽“膜打孔”假说的正确性. 此外, 实验中还观察到不同菌种的杀菌方式有一定差异. 在蜂毒肽抑杀金黄葡萄球菌过程中未见有“膜打孔”现

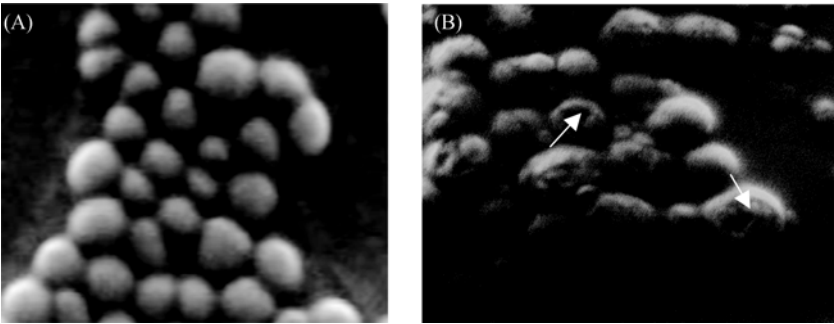


图 7 扫描电子显微镜下酵母菌的形态结构
(A) 正常的酵母菌($\times 10000$); (B) 蜂毒肽作用 4 h 后的酵母菌($\times 10000$)

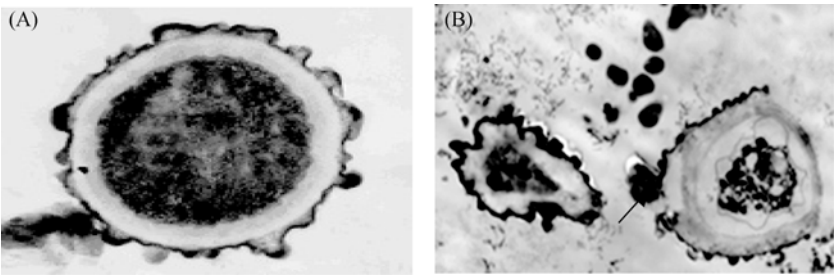


图 8 透射电子显微镜下番茄叶霉孢子的形态结构
(A) 正常的番茄叶霉孢子($\times 40000$); (B) 蜂毒肽作用 12 h 后的番茄叶霉孢子($\times 30000$)

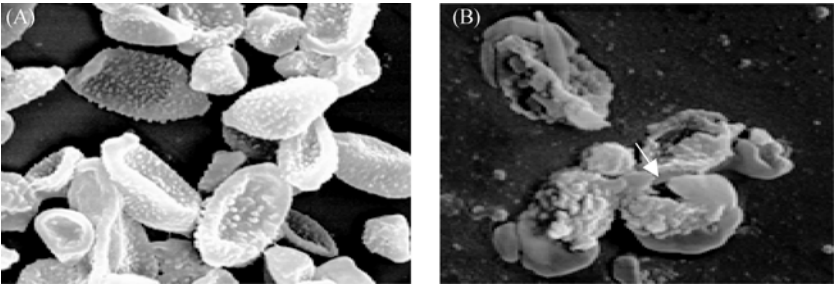


图 9 扫描电子显微镜下番茄叶霉孢子的形态结构
(A) 正常的番茄叶霉孢子($\times 9000$); (B) 蜂毒肽作用 12 h 后的番茄叶霉孢子($\times 9000$)

象, 而形成类质壁分离样空腔, 引起细胞死亡. 蜂毒肽作用番茄叶霉孢子后, 出现细胞质空腔, 最终孢子死亡. 这 3 种方式(打孔式、质壁分离式及细胞质空腔式)的现象表明, 蜂毒肽破坏细胞膜的方式有菌种差异性. 有研究表明, 就抗菌肽膜打孔方式还有“板桶模型”和“环孔模型”之说^[15], 故抗菌肽杀菌机理尚需进一步深入研究.

3.2 不同菌种抑杀菌方式差异与杀菌作用强弱的相关性

上述研究结果表明, 蜂毒肽对不同菌种的杀菌方式有一定差异. 更值得重视的是还观察到, 蜂毒肽对这 4 种菌的抑杀强弱同样有一定差异, 白菜软腐病

菌作用 1 h 杀菌率 95.8%; 金黄葡萄球菌作用 1 h 杀菌率为 50.5%, 而且 12 h 后杀菌率为 0, 出现恢复状态, 表现出抑菌作用; 酵母菌杀菌作用时间较长, 在 8 h 后杀菌率 92.2%; 番茄叶霉病孢子杀菌作用时间更长, 24 h 后杀菌率 95%, 但无恢复趋势. 由此可见, 蜂毒肽对不同菌种杀菌方式的差异与其杀菌作用的强弱及速效性有直接关系. 打孔方式杀菌作用强、速效、高效, 质壁分离式杀菌弱, 细胞质空腔式杀菌强, 但作用缓慢. 该现象是否具有普遍性及其机理尚需进一步研究.

综上所述研究结果可见, 蜂毒肽各种抑杀细胞方式的共同点是蜂毒肽与膜磷脂分子结合相互作用所致^[3].

参考文献

- 1 Boman H G, Agerbeth B, Boman A. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropinPI and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect Immun*, 1993, 61: 2978—2984
- 2 Fennell J F, Shipman W H, Cole L J. Antibacterial action of a bee venom fraction (melittin) against a penicillin-resistant staphylococcus and other microorganisms. *Res Dev Tech Rep*, 1967, 5: 1—13
- 3 Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 2002, 415 (6870): 389—395 [\[DOI\]](#)
- 4 Matsuzaki K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1462: 1—10 [\[DOI\]](#)
- 5 Yang L, Weiss T M, Lehrer R I, et al. Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophys J*, 2000, 79(4): 2002—2009 [\[DOI\]](#)
- 6 Westerhoff H V, Juretic D, Hendler R W, et al. Magainins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 6597—6601 [\[DOI\]](#)
- 7 Bierbaum G, Sahl H G. Induction of autolysis of Staphylococci by the basic peptide antibiotics pep5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. *Arch Microbiol*, 1985, 141: 249—254 [\[DOI\]](#)
- 8 Kragol G. The antibacterial peptide pyrrolicorin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochem*, 2001, 40: 3016—3026 [\[DOI\]](#)
- 9 潘凌子, 那杰, 邢卓, 等. 蜂毒肽对农作物病原菌的抑杀作用. *科学通报*, 2007, 52(3): 291—296
- 10 王关林, 李大力, 方宏筠. 蜂毒溶血肽前体蛋白 cDNA 的克隆及其融合蛋白的表达. *微生物学报*, 2001, 41(2): 181—185
- 11 王关林, 李大力, 方宏筠. 蜂毒溶血肽基因的定点突变及其在大肠杆菌中的表达. *遗传学报*, 2000, 27(2): 176—183
- 12 王关林, 邢卓, 潘凌子. 蜂毒肽对农作物生理指标及防御系统酶影响的研究. *作物学报*, 2006, 32(4): 594—596
- 13 汤雪明, 戴书文. 生物样品的环境扫描电子显微镜观察. *电子显微学报*, 2001, 20(3): 217—223
- 14 朱丽霞. 生物学中的电子显微镜技术. 北京: 北京大学出版社, 1983. 11—72
- 15 Yang L, Weiss T M, Lehrer R I, et al. Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophys J*, 2000, 79: 2002—2009 [\[DOI\]](#)