



动物血源抗菌肽的研究进展及应用

应晓彩, 刘 磊, 裴志花*, 王 开^{1*}

(吉林农业大学动物科学技术学院, 吉林长春 130118)

摘 要: 抗菌肽是一种小分子多肽, 可抵抗外源性病原微生物的侵袭。动物血液是畜禽屠宰加工的主要副产品, 具有较高的营养价值, 近年来发现血液中不但富含蛋白质, 还存在多种生物活性肽, 如免疫增强肽、抗氧化肽、抗肿瘤肽和抗菌肽等, 具有极为广阔的开发和应用前景。论文综述了动物血源性抗菌肽的分类、提取方法和临床应用, 并对其应用前景进行了展望, 为抗菌肽的应用和开发提供理论依据。

关键词: 抗菌肽; 动物血源; 应用

DOI: 10.16437/j.cnki.1007-5038.2020.09.023

中图分类号: S852.4

文献标识码: A

文章编号: 1007-5038(2020)09-0111-04

动物血液是畜禽屠宰加工的主要副产品, 在我国资源极其丰富, 是非常具有开发价值的蛋白类原料, 但其开发利用率低, 除小部分制成血粉和血浆蛋白粉, 用于饲料和食品工业外, 大部分白白弃掉, 不仅造成了蛋白质资源的浪费, 还导致严重的环境污染^[1]。目前, 人们已从多种动物血液中成功分离出抗菌肽, 并对其生物学功能进行了研究^[2]。这一发现为动物血液的开发利用及新型抗菌药物的研发提供了新思路。本文就血源性抗菌肽的分类、提取方法和临床应用进行综述。

1 动物血源抗菌肽的分类

从动物血液中提取的血源抗菌肽, 根据其血液来源不同, 可分为以下几类。

1.1 哺乳动物血源抗菌肽

我国对牛血抗菌肽的研究比较早, 1995 年从牛红细胞中提取抗菌肽, 发现其对肺炎克雷伯菌、奇异变形杆菌、铜绿假单胞菌均有良好的抑菌活性^[3]。从牛白细胞中分离出抗菌肽对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌均有抑菌活性^[4]。从牦牛红细胞中分离出抗菌肽 YakB-1 和 YakB-2 对细菌和真菌具有广谱抗菌活性^[5]。中国屠宰肉牛的牛血产量非常丰富, 但是技术条件有限, 疫病限制等因素影响下, 只有小部分被加工成饲料添加剂应用到畜牧业生产中。

我国有悠久的养猪历史, 猪肉是我国人民的主要肉食, 作为猪屠宰加工的副产品之一, 猪血来源相

当丰富。然而, 我国猪血抗菌肽的研究起步较晚^[6]。2007 年从猪血中性粒细胞中分离提取的小分子多肽具有广谱抗菌活性, 对链球菌、李斯特菌和白色念珠菌等均具有一定的抑制作用^[7]。马辉等^[8]采用乙酸萃取等方法从猪血白细胞中分离的抗菌肽, 发现其对大肠埃希菌、鸡沙门菌均有良好的抑菌活性。虽然猪血抗菌肽的研究起步较晚, 但是随着人们对猪血抗菌肽提取工艺的不断优化和改良, 猪血抗菌肽的种类在不断丰富, 抗菌活性也在不断提高, 具有良好的开发和应用价值。

近年来, 除了猪、牛等家畜外, 还从羊和驴等血液中提获得了多种抗菌肽。明双喜等^[9]从绵羊白细胞中分离的抗菌肽对大肠埃希菌、巴氏杆菌和放线菌等都具有抗菌性。布日额等^[10]在库伦驴血液白细胞中发现的抗菌肽对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和无乳链球菌具有抑菌效果。

1.2 禽类血源抗菌肽

禽血作为一种屠宰场副产物, 是屠宰场污水中难降解的主要污染物之一, 因而合理利用屠宰场禽血对环境保护和经济发展都具有重要的意义。近年来发现, 禽血富含多种抗菌肽。从新鲜鸡血中获得鸡血源抗菌肽 CHAP, 分子质量为 3.3 ku, 具有广谱高效的抗菌作用^[11], 可有效抵抗热应激造成的生产性能降低、氧化应激损伤、小肠黏膜和免疫器官的损伤及免疫功能低下。从鹅血血清分离出的 30 ku 以下组分和 10 ku 以下组分的抗菌肽, 可明显抑制胃

收稿日期: 2019-05-04

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31502021, 31572574); 吉林省科技发展计划项目(20170101021JC); 吉林省科技攻关项目(20160204002NY)

作者简介: 应晓彩(1994—), 女, 浙江绍兴人, 硕士研究生, 主要从事动物药理学。* 通讯作者

癌细胞株 HGC-2 和 SGC-7901 的细胞活力,其中 10 ku 以下组分的抗菌肽抑制作用更明显^[12]。

1.3 水生动物血源抗菌肽

不仅家畜家禽血液中富含抗菌肽,水生动物血液是抗菌肽的另一重要来源。如泥蚶是中国养殖的传统贝类之一,体内没有特定的免疫系统,只能依靠体液因子和血细胞的非特异性免疫来抵抗病原微生物的入侵。王娟娟等^[13]采用凝胶层析技术从泥蚶血细胞中提取的抗菌肽 F2-F7 对副溶血性弧菌、溶藻弧菌和哈维弧菌具有较好的抗菌活性,其 MIC 值在 0.012 mg/mL~0.200 mg/mL。暹罗鳄的血红蛋白是鳄鱼血液含量最丰富的成分,与多种生物学活性有关,主要包括抗菌活性、抗氧化活性和抗炎活性等。用胃蛋白酶水解暹罗鳄血红蛋白提取抗菌肽,发现其对大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和铜绿假单胞菌都有抗菌作用^[14]。大鲵作为一种传统中药,起源于大约 3.5 亿年前,但一直以来,大鲵的血液大多被当做废弃物扔掉了。有研究从大鲵血液中分离出的抗菌肽 andricin B 不但可以抑制蜡样芽胞杆菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌和酿酒酵母等的生长,还可作为潜在的食品防腐剂应用于食品工业中^[15]。

1.4 无脊椎动物血源抗菌肽

与脊椎动物相比,无脊椎动物没有特异的免疫系统,主要依靠先天性免疫和生物体产生的抗菌物质对抗外来病原微生物的侵袭。采用多种方法从无脊椎动物血淋巴中分离到多种抗菌肽。从血蛤中提取的抗菌肽对溶藻弧菌(MICs: 12 μ g/mL~200 μ g/mL)、副溶血性弧菌(11 μ g/mL~100 μ g/mL)和哈维弧菌(1 μ g/mL~200 μ g/mL)具有不同程度的抗菌活性^[16]。从锯缘青蟹体内分离到一类阴离子抗菌肽,对金黄色葡萄球菌、溶壁微球菌和嗜水气单胞菌具有较好的抑制作用,但其对革兰阴性菌的抑制作用相对较弱^[17]。

2 动物血源抗菌肽的提取方法

动物血液中存在多种抗菌肽,这些抗菌肽对于 G⁺ 菌和 G⁻ 菌均有较好的抑制效果。常见的提取方法主要包括物理方法、化学方法、酶解法和微生物法。

2.1 物理方法

物理方法是利用研磨、冻融、超声波破碎、细胞溶胀、盐析等方法裂解动物血液直接从其中提取天然存在的抗菌肽。将新鲜鸡血抗凝、反复冻融后研磨制成血粉,加入磷酸盐缓冲液后超声波破碎,70℃ 水浴加入等体积的饱和硫酸铵沉淀蛋白,离心得到沉淀后装入透析袋,每隔一段时间更换一次蒸馏水,

直至没有 NH₄⁺ 析出,得到的抗菌肽粗提物采用葡聚糖凝胶纯化,最后得到的抗菌肽对大肠埃希菌的抑菌效果显著,其抑菌效果高于 6 000 IU 青霉素^[18]。该方法步骤较少,操作简单,但是抗菌肽的获收率低,不适于规模化生产。

2.2 化学方法

化学方法是指用酸、碱和有机试剂等水解动物血液获得抗菌肽。将鸡血液在 20℃ 下离心后,沉淀物以 1:10 的比例重悬于 100 mL/L 乙酸中,并在 -15℃ 下冷冻,离心弃去沉淀,提取物稍微蒸发后,通过冷却的丙酮沉淀蛋白质和肽,分离得到具有抗大肠埃希菌活性的 2 种多肽 CHb-1 和 CHb-2^[19]。采集新鲜的暹罗鳄血抗凝,在 37℃ 下用 0.05 mol/L 盐酸水解 24 h,4℃ 下离心 20 min 收集溶血混合物后,用反相高效液相色谱 C4 柱分离水解产物混合物的各个组分^[20]。采用化学方法虽然能够获得抗菌肽,但反应条件严格,提取过程繁琐,且获得的抗菌肽含量普遍很低,不适合大规模生产。另外,还可能由于引入了其他化学试剂而产生毒副反应等。因此,化学法水解动物血液提取抗菌肽仅适合进行技术开发。

2.3 酶解法

酶解法是使用蛋白酶酶解动物血液进而获得抗菌肽。近些年,采用酶解法获得抗菌肽的报道日趋增多。用胃蛋白酶酶解牛血红蛋白分离得到四肽 Asn-Phe-Gly-Lys(NFGK) 对人胰腺癌细胞株 Mia-paca-2 有抗转移作用^[21]。在 37℃ 用胃蛋白酶酶解暹罗鳄血红蛋白分离出新型抗氧化和抗炎肽,证明有助于治疗与炎症和氧化应激相关的疾病^[22]。酶解法反应条件温和,营养成分不易流失,并且获得的抗菌肽活性较高,可以在一定程度上弥补化学法和物理法的不足。由于具有相对便宜、速度快、产量高和易满足工业化生产要求等特性,酶解法成为获取抗菌肽最好的方式。不同酶可以识别不同的酶切位点,根据不同酶的特异性可以得到不同的多肽产物,不同的酶最佳反应条件也不同,因此优化反应条件对提高酶活性具有重要意义。

2.4 微生物法

微生物法是利用微生物发酵动物血液从中获得抗菌肽的一种方法,该方法操作简单,蛋白质降解效果好,能将血红蛋白(Hb)等大分子蛋白质分解为多肽。国内外报道能够降解 Hb 的微生物主要包括枯草芽胞杆菌、蜡样芽胞杆菌、黑曲霉和米曲霉等。用一株枯草芽胞杆菌发酵猪血,并通过微滤、超滤、喷雾干燥等方法获得一种小分子多肽,不但具有抗菌

活性还具有一定的抗氧化、增强免疫和降血脂的作用^[23]。用一株高产酸性蛋白酶的黑曲霉发酵鸡血血红蛋白制备小分子活性肽,优化黑曲霉降解 Hb 的工艺^[24]。由于用来降解血液的微生物多为益生菌,不具有致病性,因此微生物发酵后的血液可不进行分离纯化,直接添加到饲料中,不但省去了抗菌肽的纯化步骤节约了成本,还能减少动物疾病的发生,减少抗生素的使用,提高畜禽产品的安全性。虽然微生物法提取抗菌肽应用较少,但实际上其比酶解法更简单、更经济。因此,微生物法是继酶解法之后,又一个有前景的获得血液抗菌肽的方法。

3 动物血源抗菌肽的作用机制

不同血液中分离的抗菌肽具有不同的特点。但总的来说,动物血源抗菌肽的共同特点是:①大部分为阳离子肽;②易溶于水和脂类;③组成的氨基酸数目一般少于 20 个。对于血源抗菌肽抗菌活性机制,大部分研究者认为是抗菌肽和细菌的细胞膜作用。由于血源抗菌肽多为阳离子抗菌肽,带正电荷,在细胞膜与水相界面上与磷脂分子上的负电荷由于静电吸引相互作用,将抗菌肽分子中的疏水键插入细胞膜,破坏膜上蛋白质与脂质原有的排列顺序。该序列的破坏显著增加了细胞膜的通透性,破坏了细菌外膜,抗菌肽分子疏水端插入到质膜中,然后两亲性的抗菌肽也插入细胞膜中,多个肽分子共同作用形成了离子通道,导致细菌内容物渗出,致使细菌发生不可逆损伤而死亡^[25]。

4 动物血源抗菌肽的应用

4.1 临床药用方面

近年来,由于抗生素滥用,使得多种细菌都产生了耐药性,为细菌性疾病的治疗带来了前所未有的挑战。动物血源抗菌肽抗菌谱广泛,作用机制特殊,可以直接通过靶向细菌细胞膜来杀菌,不易产生耐药性,因此很有可能作为抗菌药物应用于临床治疗领域。从猪血中分离的 3 个抗菌肽 CP590、CP591 和 CP592 与利福平、链霉素及四环素分别联合用药时,可以大幅度降低抗菌肽、抗生素的使用浓度,延长用药的药效持续时间,降低药物使用频率^[26]。LL-37 是分离自中性粒细胞的一种抗菌肽,对大肠埃希菌、鼠伤寒沙门菌和表皮葡萄球菌等具有较好的抗菌活性,有取代传统抗生素的可能性^[27]。

4.2 食品工业方面

为了保证食品的稳定,防止食物氧化是一个重要的课题。常见的人工合成抗氧化剂,这些人工合成的抗氧化剂在一定程度上对人体有害,不利于长期使用。因此,人们开始从自然界中寻找天然、安全、高

效、稳定的绿色抗氧化剂。近年来,人们发现抗菌肽不但具有抗菌活性,还具有抗氧化活性,且有良好的热稳定性,而来源于动物血液的抗菌肽分子质量较小,可以在肠道内吸收,因此,可作为食品防腐剂用于热加工食品的防腐保鲜。Bac8c 是来源于牛中性粒细胞的牛溶菌肽的线性衍生物,对革兰阳性菌和革兰阴性菌均有较强的抑菌作用,最小抑菌浓度为 $2 \mu\text{mol/L}$ ~ $16 \mu\text{mol/L}$,细胞毒性小,热稳定性高,具有作为食品防腐剂的潜力^[28]。

4.3 水产养殖业方面

随着水产养殖业的快速发展,人们越来越重视健康、环保、高效的发展模式。与传统抗生素相比,抗菌肽具有稳定性好、广谱抗菌效果好、污染小、能提高水生动物抗病性等特点,必将在未来取代传统抗生素,减少抗生素使用和滥用的危害,提高水产品的质量,实现水产养殖业的可持续发展。用金黄色葡萄球菌和副溶血弧菌刺激克氏原螯虾,分离纯化其血蓝蛋白,原核表达得到全长血蓝蛋白 Pc HMC 及血蓝蛋白的 3 个结构域 (rPc HMC1-T, rPc HMC1-C 和 rPc HMC1-N),发现对金黄色葡萄球菌和副溶血弧菌都表现出了很强的抑菌效果^[29]。

5 展望

虽然从血液中提取到了多种抗菌肽,但也存在以下几个方面问题:①生产成本低,导致产品不能批量生产。②纯化产品很难分离,产品的纯度和回收率很难保证。③产品种类较少。尽管从血液中提取抗菌肽的技术还不够成熟,但是随着技术不断的进步,我们必将突破传统技术的局限,获得更多可供临床应用的优质血源抗菌肽,提高畜禽血液的利用率,变废为宝,为畜牧业的健康发展做出应有的贡献。

参考文献:

- [1] 王 燕,易春霞,文奇男,等. 酶解血粉的单因素和响应面条件的优化[J]. 饲料工业,2017,38(15):48-54.
- [2] NEELAY O P, PETERSON C A, SNAVELY M E, et al. Antimicrobial peptides interact with peptidoglycan[J]. J Mol Structure, 2017, 11(46): 329-336.
- [3] ZHAO Q Y, PIOT J M, GAUTIER V, et al. Isolation and characterization of a bacterial growth-stimulating peptide from a peptic bovine hemoglobin hydrolysate[J]. Appl Microbiol Biot, 1996, 45(6): 778-784.
- [4] 尚田田,王 青,杭柏林,等. 牛血液白细胞源抗菌肽的纯化及活性鉴定[J]. 广东农业科学,2012,39(11):130-132.
- [5] 郝 刚,唐善虎,李思宁. 牦牛胰蛋白酶水解液中抗菌肽的筛选研究[J]. 食品工业科技,2018,39(11):121-125.
- [6] 马素敏,何立超,李成梁,等. 猪血红蛋白超声提取工艺响应面优化及超声对其结构的影响[J]. 食品工业科技,2018,39(6): 184-190.
- [7] 王延卓. 猪血中抗菌肽的提取及体外抗菌活性研究[D]. 吉林长

- 春:吉林农业大学,2007.
- [8] 马 辉,王永芬,郭宏伟,等.猪血中白细胞抗菌肽的提取及体外抑菌研究[J].黑龙江畜牧兽医,2015(3):34-36.
- [9] 明双喜,刘 艳,王沂蒙,等.绵羊白细胞抗菌肽对几株猪源致病菌的抑制作用分析[J].养猪杂志,2008(1):61-62.
- [10] 布日额,吴金花,卢雅生.库伦驴血液白细胞抗菌肽提取及其对牛乳腺炎主要致病菌的抗菌活性研究[J].中国病原生物学杂志,2011,6(10):721-723.
- [11] HU F J, WU Q X, SONG S, et al. Antimicrobial activity and safety evaluation of peptides isolated from the hemoglobin of chickens[J]. BMC Microbiol, 2016, 16(1): 287-288.
- [12] 徐国强,张尤历,袁英雪,等.鹅血有效组对胃癌细胞增殖的影响及其蛋白质谱鉴定[J].基因组学与应用生物学,2018,37(8):3719-3725.
- [13] 王娟娟,包永波,王素芳,等.泥蚶血红蛋白异源四聚体酶解多肽抗菌活性及其机理研究[J].海洋学报,2015,37(12):106-115.
- [14] LUEANGSAKULTHAI J, JANGPROMMA N, TEMSIRIPONG T, et al. A novel antibacterial peptide derived from *Crocodylus siamensis* hemoglobin hydrolysate induces membrane permeabilisation causing iron dysregulation, oxidative stress and bacterial death[J]. J Appl Microbiol, 2017, 123(4): 819-831.
- [15] PEI J, FENG Z, REN T, et al. Purification, characterization and application of a novel antimicrobial peptide from *Andrias davidianus* blood[J]. Lett Appl Microbiol, 2018, 66(1): 38-43.
- [16] BAO Y B, WANG J J, LI C H, et al. A preliminary study on the antibacterial mechanism of *Tegillarca granosa* hemoglobin by derived peptides and peroxidase activity[J]. Fish Shellfish Immunol, 2016, 51: 9-16.
- [17] 郭子好,方 华,李春源, et al. 锯缘青蟹 *Scygonadin* 抗菌肽的毕赤酵母表达及其产物抑菌活性分析[J]. 饲料研究, 2017(10): 32-36.
- [18] 高树云,刘兆仁,赵三强,等.鸡血中抗菌肽的提取、纯化和抑菌效果检测[J].农业工程技术,2012(6):32-34.
- [19] VASILCHENKO A S, ROGOZHIN E A, VASILCHENKO A V, et al. Novel haemoglobin-derived antimicrobial peptides from chicken (*Gallus gallus*) blood; purification, structural aspects and biological activity[J]. J Appl Microbiol, 2016, 121(6): 1546-1557.
- [20] PAKDEESUWAN A, ARAKI T, DADUANG S. *In vivo* wound healing activity of crocodile (*Crocodylus siamensis*) hemoglobin and evaluation of antibacterial and antioxidant properties of hemoglobin and hemoglobin hydrolysate[J]. J Microbiol Biotechnol, 2017, 27(1): 26-35.
- [21] WANG Y, ZHANG T, ZHANG H, et al. Bovine hemoglobin derived peptide Asn-Phe-Gly-Lys inhibits pancreatic cancer cells metastasis by targeting secreted Hsp90[J]. J Food Sci, 2017, 82(12): 3005.
- [22] JIRAPORN L, SANTI P, TINNAKORN T, et al. Novel antioxidant and anti-inflammatory peptides from the Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) hemoglobin hydrolysate[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2018, 65(3): 455-466.
- [23] 方 俊.猪血多肽的制备及其生物活性研究[D].湖南长沙:湖南农业大学,2006.
- [24] 张 炫.黑曲霉降解鸡血 Hb 制备小分子多肽的工艺研究[D].江西南昌:江西农业大学,2016.
- [25] 周欣宇,周春才.抗菌肽及类抗菌肽的设计、合成及应用[J].化学进展,2018,30(7):913-920.
- [26] 马沐青.猪血抗菌肽的制备及其与多种抗菌剂联合抗菌作用研究[D].吉林长春:吉林大学,2016.
- [27] 华 蕊,吴科榜,管庆丰,等.人源抗菌肽 LL-37 对畜禽病原菌的抑菌活性及体外稳定性研究[J].畜牧与兽医,2019,51(4): 43-47.
- [28] 曹宋宋,李盈盈,姜成刚,等.牛溶菌肽线性衍生物 Bac8c 的抑菌活性及其稳定性[J].中国食品学报,2018,18(10):95-101.
- [29] 秦真东.鱼类红细胞和虾类血淋巴细胞的免疫特性和抗菌机理研究[D].湖北武汉:华中农业大学,2018.

Progress and Application of Animal Blood-derived Antibacterial Peptides

YING XIAI-cai, LIU Lei, PEI Zhi-hua, WANG Kai

(College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin, 130118, China)

Abstract: Antimicrobial peptides are small molecular polypeptides that can resist the invasion of various exogenous pathogenic microorganisms. Animal blood is the main by-product of slaughtering and processing of livestock and poultry. It has high nutritional value. In recent years, it has been found that blood is not only rich in protein, but also contains a variety of bioactive peptides, such as immunopotentiator, antioxidant, antineoplastic and antimicrobial peptides, which have very broad prospects for development and application. In this paper, the classification, extraction methods and clinical application of animal blood-derived antimicrobial peptides were reviewed, and their application prospects were prospected. It provided a theoretical basis for the application and development of antimicrobial peptides.

Key words: antimicrobial peptide; animal blood; application