

海洋鱼类和青蟹抗菌肽 hepcidin 和 scygonadin 的研究

王克坚

(厦门大学 海洋与环境学院, 近海海洋环境科学国家重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 抗菌肽或抗微生物肽因具有杀死或抑制微生物的共同特性, 近年来科学家又将这些肽类称为“天然抗生素”, 有望在将来作为一种新型的生物药物替代现有的化学类抗生素. 海洋动物中蕴藏着世界上丰富的抗菌活性物质, 研究与开发应用海洋动物抗菌肽成为近年来的研究热点. 结合国内外的相关研究进展, 简要总结了课题组近年来在我国海水养殖鱼类抗菌肽 hepcidin 和青蟹抗菌肽 scygonadin 的研究进展, 从抗菌肽的蛋白分离、纯化、基因克隆、基因表达模式、基因工程表达以及抗菌肽合成与表达产品的抗菌活性等进行了简要细致的叙述, 对深入探索海洋动物抗菌肽在我国水产养殖业的开发应用具有重要的参考价值.

关键词: 海洋鱼类; 青蟹; 抗菌肽; hepcidin; scygonadin; 基因克隆; 基因表达; 抗菌活性; 海水养殖业

中图分类号: Q 78

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2011)02-0418-07

20 世纪 80 年代初, Steiner 等从天蚕 (*Hyatophora cecropia*) 蛹中首次分离到天蚕杀菌肽 (cecropins)^[1], 继之 Zasloff 从南非爪蟾 (*Xenopus laevis*) 皮肤中分离到防护素 (magainin)^[2], 人们逐渐发现其在医药领域具有潜在的应用前景, 由此揭开了在不同生物种类研究抗菌肽的序幕. 30 年来, 大量低分子质量具有抗微生物活性的天然化合物从各类生物分离出来, 其中多肽类物质通称为“抗菌肽”或“抗微生物肽” (antimicrobial peptides, AMP), 因具有杀死或抑制微生物的共同特性, 近年来科学家又将这些肽类称为“天然抗生素”. 它们抗菌谱很广, 包括细菌、真菌、寄生虫^[3]和病毒^[4], 甚至具有抗肿瘤细胞的活性及铁代谢调节功能^[5,6]. 这些天然抗生素, 可直接引起宿主先天性免疫应答, 并能对广泛的病原菌做出高效而迅速的响应^[7], 甚至对成团细菌也起作用^[8], 因而有望在将来作为一种新型的生物药物替代现有的化学类抗生素. 科学界

已趋向认同的观点是未来优先考虑发展替代药物或者发现抗微生物的天然物质, 以找到可持续、有效控制病原性疾病的新途径. 已公认抗菌肽可以作为治疗抗生素耐药性细菌感染或败血病性休克的药物来源^[9], 并具有中和毒素以及参与免疫调节等功能^[10], 抗菌肽的研究已成为医药学、免疫学和分子生物学等相关学科的研究热点.

目前从高等植物、昆虫、两栖类直至哺乳动物等各类生物中分离、鉴定或推导的抗菌肽序列约 1 700 条 (APD: <http://aps.vnmc.edu/AP/about.php>, 2011 年 1 月), 主要包括从生物的组织 and 细胞产生的抗菌肽、特定的细胞因子和趋化因子、选择性神经肽和肽类激素、以及大蛋白质的片段. 抗菌肽数据库也相应的建立起来, 如 Penaeidins 数据库 PenBas^[11]、APD (antimicrobial peptide database)^[12] 和 ANTIMIC^[13] 等, 极大地方便了不同生物源抗菌肽的比较研究和新抗菌药物的筛选.

国际学术界早已高度认识到海洋动物中蕴藏着世界上丰富的抗菌活性物质, 挖掘海洋动物抗菌肽成为近年来的研究热点. 目前已从多种海洋动物中分离到多种多样的抗菌肽, 其中鱼、虾、蟹等的抗菌肽报道比较多.

1 鱼类抗菌肽 hepcidin

hepcidin 是近年来在人的血液和尿液中首先发现

收稿日期: 2010-11-29

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 重点项目 (2007AA091406); 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2002AA603013); 国家自然科学基金项目 (40676083, 30700625); 福建省重大科技项目 (2003I005); 福建省重点科技计划项目 (2008N0043); 福建省重点项目 (2007I0022); 福建省发改委 (闽发改高技 (2008) 264 号); 厦门市高新技术项目 (3502Z20021052); “闽江学者”奖励计划

的一类具有独特性质的抗菌肽^[14-15], 在结构域中富含 8 个半胱氨酸, 由于其不仅具有抗菌作用且具有铁代谢调节功能, 因而随后成为医学上的研究热点. 鱼类 hepcidin 的研究报道始于 2002 年, Shike 等首先在细菌诱导的杂交斑纹鲈鱼 (*Morone saxatilis* × *M. chrysops*) 鳃中发现了抗菌肽 hepcidin^[16], 此后国内外学者在大西洋鲑鱼 (*Salmo salar*), 美洲拟鲈 (*Pseudopleuronectes americanus*)^[17], 斑马鱼 (*Danio rerio*)^[18], 鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*)^[19-22], 牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[23-24], 真鲷 (*Pagrus major*)^[25-27], 黑鲷 (*Sparus macrocephalus*)^[28-30], 尼罗罗非鱼 (*Tilapia nilotica*)^[31-32], 鱒鱼 (*Salmo gairdneri*)^[33], 大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*)^[34-35], 条石鲷 (*Oplegnathus fasciatus*)^[36], 三隅棱箱鲀 (*Pagrus auriga*)^[37] 等克隆获得了 hepcidin 基因, 发现其广泛存在于海洋鱼类和多种组织中, 预示其是一种有开发应用前景的抗菌肽.

厦门大学抗菌肽课题组自 2002 年起, 在海洋鱼类开展了抗菌肽 hepcidin 的系列研究, 研究进展如下:

1.1 抗菌肽 hepcidin 基因及其变体的分离与鉴定

本课题组系统地开展了我国重要海水养殖鱼类抗菌肽 hepcidin 的研究, 先后从我国大黄鱼^[34]、鲈鱼^[19-22]、真鲷^[25, 27]、黑鲷^[28-30]、石斑鱼^[38] 以及广盐性罗非鱼^[31] 等获得了近 20 个抗菌肽 hepcidin 基因, 阐明了其完整的 hepcidin cDNA 序列和基因组 DNA 序列, 揭示了其基因组结构. 分析发现真鲷、鲈鱼、大黄鱼、石斑鱼、黑鲷等 hepcidin 都存在 2 个以上的基因变体, 其中黑鲷有 7 个不同基因变体^[28], 证明了 hepcidin 基因在鱼类中存在多基因变体现象, 与人类及其他哺乳类动物有显著区别; 这种现象反映出鱼类在复杂的海洋环境下可能需要多基因变体参与自身的免疫防御功能^[28, 34], 揭示了 hepcidin 是海水养殖鱼类普遍存在的重要免疫防御因子, 为该抗菌肽的广泛应用性提供了理论依据.

1.2 抗菌肽 hepcidin 基因的组织表达特性和诱导表达机制

以黑鲷和大黄鱼为研究对象, 比较研究了 hepcidin 基因在正常生长、LPS 刺激和细菌感染下的组织表达特性和诱导表达机制, 揭示了 hepcidin 基因在正常状态下的组织分布和细菌感染下的诱导表达模式, 发现 hepcidin mRNA 在正常养殖的黑鲷和大黄鱼的多组织中分布但有显著差异, 黑鲷 hepcidin 基因主要

存在于肝脏^[28]和肾脏^[30], 而在大黄鱼则主要存在于肾脏, 肝脏中含量很低^[34]. 源于同一种鱼类的基因变体转录本分布特性也显著不同, *AS-hepc 2* 在肝脏含量高, 而 *AS-hepc 6* 主要在肾脏含量高^[30]. 用 LPS 刺激和细菌感染发现, 黑鲷体内两种不同变体 *AS-hepc 2* 和 *AS-hepc 6* 基因的诱导表达模式有显著差异, *AS-hepc 2* 在肾、肝、脾和胃中显著表达, 而 *AS-hepc 6* 则在血液、脾和鳃中显著表达; 绝对定量 PCR 检测显示 *AS-hepc 6* 的转录本要比 *AS-hepc 2* 高出数百至数万倍^[30]; 而 LPS 刺激后的大黄鱼 hepcidin 基因的表达模式与黑鲷 hepcidin 基因显著不同, 分别在刺激后的 12, 24 和 48 h 后, hepcidin 基因在脾和心脏中显著诱导表达, 肝脏中无明显表达, 而在肾脏虽未见显著诱导表达但 hepcidin 基因水平始终维持较高的水平, 属组织型表达^[34], 因此大黄鱼 hepcidin 基因的表达不是肝脏依赖型. 在我国养殖鱼类的这些研究发现, 与已经报道的人、鼠和其他鱼类 hepcidin 基因的表达模式显著不同, 证明肝脏不是普遍认为的唯一的 hepcidin 基因高效表达的器官, 肾脏是另一个主要高表达的器官^[30, 34]. 这些新的研究结果提示, hepcidin 的基因表达模式表现为组织型和诱导型, 不同鱼类的 hepcidin 因所处的生存环境可能采取不同的免疫机制^[34], 为深入研究鱼类 hepcidin 的免疫机制提供了新的数据.

1.3 基因工程表达产物 hepcidin 的高效抗细菌、真菌活性

大黄鱼 PG-hepc、黑鲷 AS-hepc2 和 AS-hepc6 等前导肽或成熟肽可以通过化学合成或者构建高效表达载体获得 hepcidin 产品. 由于 hepcidin 结构域中含有 8 个半胱氨酸, 可形成 4 个二硫键, 因此化学合成 hepcidin 有难度, 基于目前多肽的合成技术一些鱼类 hepcidin 难于合成. 利用基因工程技术, 通过大肠杆菌和毕赤酵母表达系统高效表达出多个鱼类 hepcidin 基因工程产品. 研究发现大黄鱼 PG-hepc 合成物对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌具有显著的选择抗性, 对鱼类重要致病菌嗜水气单胞菌、副溶血弧菌、哈氏弧菌和溶藻弧菌等具有很强的抑菌活性^[34], 而且还具有显著的抗金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌等耐药性细菌的作用, 对真菌 (如禾谷镰孢菌) 也表现较强的活性^[34]. 同样, 对黑鲷 *AS-hepc 2* 和 *AS-hepc 6* 基因工程产品的研究发现, 两种表达产物对革兰氏阴性菌嗜水气单胞菌、哈氏弧菌, 革兰氏阳性菌溶壁微球菌、金黄色葡萄球菌等都表现显著的抗菌活性. 这些结果与其他鱼类 hepcidin 的抗菌特性不同, 表明不同鱼类及不同变体的 hepcidin 具有选择性的抗菌特性和抗菌谱^[34]. 另

外,试验证明大黄鱼 PC-hepc 对钠盐耐受性强,这些研究工作为抗菌肽产品的目标性应用奠定了基础。

1.4 hepcidin 基因工程产品的安全性

用纯化的大黄鱼 *hepcidin* 基因表达产品在实验动物鼠上进行急性毒性试验和遗传毒性试验,证明 *hepcidin* 无毒性。在海水养殖鱼类真鲷、鲈鱼等的试验也证明 *hepcidin* 对鱼的生长及一些免疫学指标无影响。

2 蟹类抗菌肽 scygonadin

虽然自 20 世纪 80 年代起,不断有新抗菌肽从昆虫和其他生物中分离的报道,但在蟹上明确鉴定的第一个抗菌肽是 Schnapp 等于 1996 年从岸蟹 (*Carcinus maenas*) 的血细胞溶解产物中获得的,对这个 6.5 ku 抗菌肽 N-末端进行部分测序,发现其氨基酸序列与哺乳动物的 *bactenecin 7* 相近,为富含脯氨酸的阳离子两性分子,具有抗革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌的活性^[39]。之后, Relf 等从岸蟹颗粒细胞中分离到一个 11.5 ku 抗菌肽 *crustin*, 该蛋白对热稳定,耐高盐,仅对海洋革兰氏阳性细菌有很强杀菌力,10 mg/L 即可杀死细菌,氨基酸序列与已知抗菌肽序列不同,但与人类抗白细胞蛋白酶同源性^[40]。同年, Khoo 等报道从蓝蟹 (*Callinectes sapidus*) 血细胞中分离到一个 3.7 ku 抗大肠杆菌活性的抗菌肽 *callinectin*, 其氨基末端富含脯氨酸但与其他富含脯氨酸的抗菌肽不同,不形成 Pro-Arg-Pro 模体,与已知抗菌肽同源性弱^[41]。已报道的蟹类抗菌肽基本都是从血细胞中分离获得的。迄今从动物分离获得的抗菌肽大部分源于血液、皮肤、粘液等,有关从动物生殖系统中分离抗菌肽的研究较少。由于大多数生物的生殖系统直接与外界环境接触,易于受到有害微生物的侵染,但在正常情况下生物体能够保持生殖系统的无菌状态而行使繁育功能,因而动物的生殖系统可能是抗菌肽的另一重要来源。近些年来,人们陆续发现在哺乳动物生殖系统中存在抗菌肽,如防御素家族成员^[42-43]和 *cathelicidin* 家族成员^[44-45],这些抗菌肽对性传播疾病、不育症和乳腺炎的治疗等具有重要的作用。同样在无脊椎动物的果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 中,发现一种抗菌肽 *andropin* 在雄性中特异性表达,并在交配时一起转移到雌性的体内,其主要功能是在交配过程和交配后的一段时间内,防止微生物的侵染^[46]。此外,还在地中海雌性果蝇 (*Ceratitis capitata*) 的副性腺内分离出两种组成型表达抗肽菌 *ceratotoxin A* 和 *B*,在排出体外的卵

表面可以检测到,因而认为该类多肽可以保护卵防止细菌的感染^[46]。可见昆虫和哺乳动物的雄性和雌性生殖道的抗菌肽可以抵御微生物的入侵。在甲壳动物中, Jayasankar 等报道从锯缘青蟹精浆中分离到的一种分子质量约为 20 ku 的蛋白质,可抑制海洋中常见细菌的生长^[47]; Haug 等报道在 4 种甲壳动物 (*Hyas araneus*, *Pagurus bernhardus*, *Pandalus borealis*, *Paralithodes camtschatica*) 的精浆检测到有抗菌活性^[48],虽然未见两组学者继续进行相关抗菌蛋白或多肽的研究报道,但却预示着在蟹类的精浆中存在着抗菌多肽或蛋白。

拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 以前在福建海域曾统称为锯缘青蟹 (*Scylla serrata*), 简称青蟹,是我国重要的海洋经济蟹类之一。虽然我国青蟹的全人工育苗在养殖、增殖等方面已经取得成功,但目前人工育苗技术问题严重制约着青蟹养殖业的健康发展^[49], 仍有许多科学技术问题急需解决,如在人工育苗中交配后的雌蟹纳精囊中精子成活率低与抱卵期胚胎发育以及幼体阶段经常出现大量死亡等,严重时导致无苗可育,直接影响了青蟹养殖业的发展。因此,维护亲体和胚胎健康,已经成为青蟹人工育苗中首要解决的关键科学问题之一。甲壳动物生殖生物学的研究,迄今主要以性腺生物学、生殖内分泌和生殖营养为主,对于青蟹生长发育过程中的免疫相关研究甚少,因而开展青蟹生殖免疫和生殖保护的研究,对于人工育苗技术的顺利实施和养殖产业的可持续发展具有重要意义。

本课题组利用离子交换和反向层析技术,从我国重要海水养殖青蟹中,分离纯化到一种新的抗菌肽,命名为 *scygonadin*^[50-52]。研究进展如下:

2.1 源于青蟹精浆的新抗菌肽 scygonadin

本课题组利用离子交换和反相层析等蛋白质分离技术,从我国海水养殖青蟹的精浆中分离纯化出一个 10.8 ku 多肽;经质谱分析鉴定发现是一种新的抗菌肽,因其源自青蟹的雄性生殖系统,且具有抗菌活性,因而本课题组将其命名为 *scygonadin*, 属国内外首次报道^[51-52]。*scygonadin* 是一种在甲壳动物中首次发现的与生殖免疫相关的抗菌肽,预测在青蟹授精与胚胎发育中具有重要的生殖免疫功能。

2.2 抗菌肽 scygonadin 的基因结构^[50, 52]

scygonadin 的基因结构明显不同于其他甲壳动物的抗菌肽,包含有 3 个外显子和 2 个内含子,编码 126 个氨基酸,由信号肽(24 个氨基酸残基)和成熟肽(102 个氨基酸)两部分组成,成熟肽平均分子质量为

11 271. 82 u, pI 为 6. 09, 是一种阴离子肽. 3 个外显子分别为 187, 131 和 218 bp, 信号肽由外显子 1 编码, 成熟肽部分由 3 个外显子共同编码. 2 个内含子的大小差异显著, 内含子 1 为 1 569 bp, 内含子 2 仅有 120 bp. 该基因结构明显不同于其他甲壳动物的抗菌肽.

在研究 scygonadin 过程中, 还克隆获得了另一个与 scygonadin 具有约 65% 同源性的 cDNA 序列, 经序列比较和抗菌活性鉴定, 确定为新的抗菌肽 SCY2 (GenBank 登录号: AY864802). SCY2 全长 cDNA 序列 947 bp, 编码 100 个氨基酸, 预测分子质量约为 10 925. 4 ku, 等电点 pI 为 4. 84, 基因组全长为 2 607 bp, 包含 3 个外显子和 2 个内含子. SCY2 基因的 5' 上游序列含有转录起始位点及 TATA box 等启动子所具有的特征序列^[53].

2.3 抗菌肽 scygonadin 和 SCY2 的表达

模式^[54]

1) 在性成熟组织器官中: 正常生长的成熟雄性和雌性青蟹的各组织中均检测到 scygonadin 基因的转录表达, 在大多数组织中微弱表达. scygonadin 基因主要在雄性青蟹的射精管中高表达, 其次为血淋巴细胞; 在雌性青蟹中主要以血淋巴细胞的表达量为最高, 其次为鳃. 而 SCY2 基因主要在青蟹雄性生殖系统的射精管和后输精管中特异性高表达, 在其他雄性和所有雌性组织器官中均未见转录本, 说明 SCY2 是雄性特异性表达的抗菌肽基因.

2) 在青蟹不同发育阶段: 在青蟹胚胎期、溞状幼体 I 期、溞状幼体 III 期、大眼幼体、仔蟹以及性腺不同发育程度和性成熟等各发育阶段的青蟹, 均检测到一定量的 scygonadin 转录本, 而在胚胎一仔蟹阶段未检测到 SCY2 基因的转录本. scygonadin 基因在幼体和成年期不同发育阶段的青蟹射精管中的转录表达量差异极显著, 其中幼体和 100 g 以下体质量的青蟹表达量较低, 但在 300 g 左右青蟹射精管中的表达量显著升高. SCY2 基因在成年青蟹的射精管中高表达, 以 300 g 左右性成熟的青蟹射精管中表达量最高.

3) 在青蟹繁殖高峰阶段: 4—5 月份是闽南地区青蟹生殖高峰期, 此时 scygonadin 和 SCY2 在射精管组织中的表达量显著高于其他月份 (检测 1—6 月份), 在正常繁殖高峰期表达水平极显著升高, 其中 5 月份最高.

4) 诱导方式: 以 LPS、嗜水气单胞菌和白假丝酵母等微生物刺激青蟹, scygonadin 和 SCY2 基因未被显著诱导表达, 而在青蟹交配前后 scygonadin 和 SCY2 基因在雄性射精管的表达水平有显著的变化,

说明 scygonadin 和 SCY2 的表达不是直接由细菌感染诱导, 而是性成熟或交配诱导. 上述研究成果表明 scygonadin 和 SCY2 的诱导表达与生殖免疫的功能相关.

5) SCY 蛋白广泛存在于多组织器官中: 对青蟹进行免疫组织化学检测, 发现 SCY 蛋白在雄性青蟹组织器官如精巢、前输精管贮精囊、后输精管、射精管、后射精管肌肉、神经、阴茎、真皮、鳃、中肠和肝胰腺中表达量均较高; 在雌性青蟹组织如卵巢、神经、肝胰腺、肌肉、生殖道、鳃、纳精囊、真皮、心和肠中也有较高表达.

6) SCY 蛋白具有高效抗菌活性: 通过基因工程技术获得了 scygonadin 基因的表达产物, 证明其对病原菌有较强的杀菌作用, 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌具有选择性的抗菌特性^[55].

scygonadin 是迄今在甲壳动物中首次发现的一种与生殖免疫相关的抗菌肽, 推测在受精与胚胎发育中具有重要的生殖免疫功能^[52]. 生殖免疫对于保障青蟹亲体质量和胚胎发育等具有重要意义, 是我国人工育苗中急待阐明的重要科学问题之一. 通过研究 scygonadin 从交配至胚胎发育过程中的生殖免疫机制和保护作用, 将有助于解决人工育苗中的首要关键科学问题. 同时, 这些研究工作为进一步揭示青蟹在复杂的海水养殖环境中如何成功受精与维持正常胚胎发育等免疫机制提供了珍贵的研究素材.

3 抗菌肽在我国水产养殖业的应用前景

水产养殖过程中过量应用抗生素导致的细菌耐药性增强、水产品中违禁抗生素超量以及水环境污染等严重生产问题, 是目前制约我国水产养殖业健康发展的瓶颈, 不仅阻碍我国水产品的国内外贸易, 而且严重威胁到我国国民的食品安全. 国际上许多发达国家已经制定出相关法律条文, 逐渐禁止养殖业应用抗生素以及含有抗生素的水产品进口和销售. 因此, 寻找能够替代传统饲料中或者传统预防疾病中的抗生素药物, 研制环保型饲料添加剂或者生物农药, 已成为我国水产养殖业生产发展的迫切需求, 也是当今新型无公害水产养殖的发展趋势.

抗菌肽是一类具有很强的广谱抗细菌活性的天然小肽类物质, 其抗菌机制不同于抗生素, 由于分子质量小, 极易扩散到感染部位, 使用后不存在产生耐药性问题, 且进入机体后无有害残留. 因此, 抗菌肽的研发与

应用, 将是实现海水养殖动物健康养殖、减少抗生素污染的重要保障。近年来国内外高度认识到海洋动物中蕴藏着世界上丰富的抗菌活性物质, 从海洋动物中研究开发具有抗耐药性细菌的抗生素有效替代品将是未来医学、农业、药学等发展的必然方向。因此, 充分利用并发掘我国海洋动物的抗菌肽资源, 研发出高效抗菌的抗菌肽基因工程产品, 作为研发优质饲料的添加剂或者环境友好型生物农药, 以期替代部分抗生素, 对我国水产养殖业的可持续健康发展具有重要的科学价值和应用前景。

参考文献:

- [1] Steiner H, Hultmark D, Engstrom A, et al. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity[J]. *Nature*, 1981, 292: 246-248.
- [2] Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(15): 5449-5453.
- [3] Vizioli J, Salzet M. Antimicrobial peptides: new weapons to control parasitic infections? [J]. *Trends in Parasitol*, 2003, 6(3): 89-91.
- [4] Chernysh S, Kim S I, Becker G, et al. Antiviral and anti-tumor peptides from insects [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(20): 12628-12632.
- [5] Pigeon C, Ilyin B, Courselaud P, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 7811-7819.
- [6] Chen J Y, Lin W J, Lin T L, et al. A fish antimicrobial peptide, tilapia hepcidin TH23, shows potent antitumor activity against human fibrosarcoma cells[J]. *Peptides*, 2009, 30(9): 1636-1642.
- [7] Hoffmann J A, Reichhart J M. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective [J]. *Nature Immunol*, 2002, 3(2): 121-126.
- [8] Singh P K, Parsek M R, Greenberg E P, et al. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development[J]. *Nature*, 2002, 417(6888): 552-555.
- [9] Brogden K A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3: 238-250.
- [10] Hancock R E W, Brown K L, Mookherjee N. Host defence peptides from invertebrates: emerging antimicrobial strategies[J]. *Immunobiol*, 2006, 211: 315-322.
- [11] Gueguen Y, Garnier J, Robert L, et al. The shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: sequence based classification and recommended nomenclature [J]. *Dev Comp Immunol*, 2006, 30: 283-288.
- [12] Wang Z, Wang G. APD: the antimicrobial peptide database[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: 590-592.
- [13] Brahmachary M, Krishnan S, Koh J, et al. ANT IMIC: a database of antimicrobial sequences [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: 586-589.
- [14] Krause A, Neitz S, Magert H J, et al. LEAP 1, a novel highly disulfide bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity [J]. *FEBS Lett*, 2000, 480: 147-150.
- [15] Park C H, Valore E V, Waring A J, et al. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(11): 7806-7810.
- [16] Shike H, Lauth X, Westerman M E, et al. Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge [J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269: 2232-2237.
- [17] Douglas S E, Gallant J W, Liebscher R S, et al. Identification and expression analysis of hepcidin-like antimicrobial peptides in bony fish [J]. *Dev Comp Immunol*, 2003, 27: 589-601.
- [18] Shike H, Shimizu C, Lauth X, et al. Organization and expression analysis of the zebrafish hepcidin gene, an antimicrobial peptide gene conserved among vertebrates [J]. *Dev Comp Immunol*, 2004, 28: 747-754.
- [19] 王克坚, 周红铃, 杨明. 海水养殖鲈鱼分离出一种 hepcidin 抗菌肽新基因 [J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2004, 43(3): 286-287.
- [20] Ren H L, Wang K J, Zhou H L, et al. Cloning and organization analysis of a hepcidin-like gene and cDNA from Japan sea bass, *Lateolabrax japonicus* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2006, 21(3): 221-227.
- [21] 杨明, 王克坚, 陈君慧. 海水养殖花鲈组织 hepcidin 抗菌肽基因克隆与序列分析 [J]. *台湾海峡*, 2006, 25(3): 330-335.
- [22] 陈君慧, 王克坚, 周红玲, 等. 花鲈肝脏 hepcidin 相关 cDNA Hpc2 的克隆及序列分析 [J]. *中国生态农业学报*, 2007, 15(3): 129-132.
- [23] Kim Y O, Hong S, Nam B H, et al. Molecular cloning and expression analysis of two hepcidin genes from olive flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, 69(7): 1411-1414.
- [24] Hirono I, Hwang J Y, Ono Y, et al. Two different types of hepcidins from the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *FEBS*, 2005, 272: 5257-5264.
- [25] 杨明, 王克坚, 周红玲, 等. 我国海水养殖真鲷分离出 hepcidin 抗菌肽新基因 [J]. *高技术通讯*, 2004, 14(Sup.): 323-328.
- [26] Chen S L, Xu M Y, Ji X S, et al. Cloning, characteriza-

- tion, and expression analysis of hepcidin gene from red sea bream (*Chrysophrys major*) [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49(4): 1608-1612.
- [27] 杨明, 王克坚, 曲海东, 等. 真鲷鳃组织 cDNA 文库的构建与 hepcidin 抗菌肽基因序列的扩增[J]. *水产学报*, 2006, 30: 627-632.
- [28] Yang M, Wang, K J, Chen J H, et al. Genomic organization and tissue specific expression analysis of hepcidin like genes from black porgy (*Acanthopagrus schlegelii* B.) [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, 23(5): 1060-1071.
- [29] 蔡晶晶, 杨明, 蔡灵, 等. 黑鲷抗菌肽 Hepcidin2 在毕赤酵母中的表达及其抗菌活性[J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2009, 48(5): 738-743.
- [30] Yang M, Chen B, Cai J J, et al. Molecular characterization of hepcidin AS-hepc2 and AS-hepc6 in black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*): expression pattern responded to bacterial challenge and in vitro antimicrobial activity[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 2011, 158: 155-163.
- [31] 黄文树, 李少菁, 蔡灵, 等. 尼罗罗非鱼 Hepcidin 基因结构与序列分析[J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2007, 46(3): 390-395.
- [32] Huang P H, Chen J Y, Kuo C M. Three different hepcidins from tilapia, *Oreochromis mossambicus*: analysis of their expressions and biological functions[J]. *Molecular Immunology*, 2007, 44(8): 1922-1934.
- [33] Chiou P P, Lin C M, Bols N C, et al. Characterization of virus/ double stranded RNA-dependent induction of antimicrobial peptide hepcidin in trout macrophages[J]. *Dev Comp Immunol*, 2007, 31: 1297-1309.
- [34] Wang K J, Cai J J, Cai L, et al. Cloning and expression of a hepcidin gene from a marine fish (*Pseudosciaena crocea*) and the antimicrobial activity of its synthetic peptide[J]. *Peptides*, 2009, 30(4): 638-646.
- [35] Zheng W, Liu G, Ao J, et al. Expression analysis of immune relevant genes in the spleen of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) stimulated with poly I: C [J]. *Fish Shellfish Immunology*, 2006, 21(4): 414-430.
- [36] Cho Y S, Lee S Y, Kim K H, et al. Gene structure and differential modulation of multiple rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) hepcidin isoforms resulting from different biological stimulations[J]. *Dev Comp Immunol*, 2009, 33: 46-58.
- [37] Martir Antonio B, Jimenez Cantizano R M, Salas-Leiton E, et al. Genomic characterization and gene expression analysis of four hepcidin genes in the redbanded seabream (*Pagrus auriga*) [J]. *Fish Shellfish Immunology*, 2009, 26(3): 483-491.
- [38] 邓尚龙. 石斑鱼抗菌肽基因的克隆、表达及抗菌活性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2008.
- [39] Schnapp D, Kemp G D, Smith V J. Purification and characterization of a proline rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin 7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas* [J]. *Eur J Biochem*, 1996, 240(3): 532-539.
- [40] Relf J, Chisholm J R, Kemp G D, et al. Purification and characterization of a cysteine rich 11.5 kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas* [J]. *Eur J Biochem*, 1999, 264(2): 350-357.
- [41] Khoo L H, Robinet D W, Noga E J. Callinectin an antibacterial peptide from the blue crab *Callinectes sapidus*, hemocytes[J]. *Mar Biotechnol*, 1999, 1(1): 44-51.
- [42] Com E, Bourgeon F, Evrard B, et al. Expression of antimicrobial defensins in the male reproductive tract of rats, mice, and humans [J]. *Biol Reprod*, 2003, 68: 95-104.
- [43] King A E, Fleming D C, Critchley H O D, et al. Differential expression of the natural antimicrobials, beta defensins 3 and 4, in human endometrium[J]. *J Reprod Immunol*, 2003, 59: 1-16.
- [44] Malm J, Sorensen O, Persson T, et al. The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18) is expressed the epithelium of human epididymis, is present in seminal plasma at high concentrations, and is attached to spermatozoa[J]. *Infect Immunol*, 2000, 68(7): 4297-4302.
- [45] Sorensen O E, Gram L, Johnsen A H, et al. Processing of seminal plasma hCAP 18 to ALL-38 by gastricsin: a novel mechanism of generating antimicrobial peptides in vagina[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(31): 28540-28546.
- [46] Lung O, Kuo L, Wolfner M F. Drosophila males transfer antibacterial proteins from their accessory gland and ejaculatory duct to their mates[J]. *J Insect Physiol*, 2001, 47: 617-622.
- [47] Jayasankar V, Subramoniam T. Antibacterial activity of seminal plasma of the mud crab *Scylla serrata* (Forsk.) [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 1999, 236: 253-259.
- [48] Haug T, Kjuul A K, Stensvåg K, et al. Antibacterial activity in four marine crustacean decapods[J]. *Fish Shellfish Immunology*, 2002, 12(5): 371-385.
- [49] 李少菁, 王桂忠. 锯缘青蟹繁殖生物学及人工育苗和养成技术的研究[J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2001, 40(2): 552-565.
- [50] 黄文树. 锯缘青蟹一种新的阴离子抗菌肽 scygonadin 及其基因的分离与鉴定[D]. 厦门: 厦门大学, 2006.

- [51] Huang W S, Wang K J, Yang M, et al. Purification and part characterization of a novel antibacterial protein scygonadin, isolated from the seminal plasma of mud crab, *Scylla serrata*(Forkal , 1775) [J]. J Exp Mar Biol EcoI, 2006, 399: 37-42.
- [52] Wang K J, Huang W S, Yang M, et al. A male specific expression gene, encodes a novel anionic antimicrobial peptide, scygonadin, in *Scylla serrata*[J]. Mol Immunol, 2007, 44: 1961-1968.
- [53] 陈慧芸. 锯缘青蟹阴离子抗菌肽 SCY2 基因克隆、表达特性及其抗菌活性的研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2007.
- [54] 许婉芳. 拟穴青蟹两种 scygonadin 抗菌肽的表达特性及免疫机制的研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2008.
- [55] Peng H, Yang M, Huang W S, et al. Soluble expression and purification of a crab antimicrobial peptide scygonadin in different expression plasmids and analysis of its antimicrobial activity [J]. Protein Expression and Purification, 2010, 70: 109-115.

Studies of Antimicrobial Peptides Hecpidin and Scygonadin in Chinese Marine cultured Fishes and Mud Crab

WANG Ke-jian

(State Key Laboratory of Marine Environmental Science, College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The small native compounds are isolated from various species of lives, with resistant activity against bacteria, are known as “antibacterial peptides” or “antimicrobial peptides”(AMPs) and are also thought as “natural antibiotics” in recent years by scientists. It is widely acknowledged that these defensive compounds or AMPs could become new types of bio-antibiotics substituting for the currently used chemical antibiotics in near future. More and more people in the world realize that there are luxuriant AMPs existing in the marine animals, plants and microorganisms. The study of AMPs in marine animals is now the hotspot in research, thus attracting many researchers engaged in this area. The author briefly summarizes some typical results obtained from the study of AMPs in his group in recent several years. His group has done a lot of work in mining of genes and isolation of proteins which are related to antimicrobial activity from Chinese cultured fishes and crabs. More than 20 hecpidin cDNA sequences have been identified and the gene expression patterns were investigated in normal and bacterial challenged fish including *Lateolabrax japonicus*, *Pagrus major*, *Sparus macrocephalus*, *Tilapia nilotica*, *Pseudosciaena crocea*. Meanwhile, a novel anionic antimicrobial peptide named scygonadin was in detailed described, which was first isolated by HPLC from the seminal plasma of *Scylla serrata* and was characterized by mass spectral analysis in his group. Its cDNA sequence was revealed and its expression patterns in tissues and in the developmental stages from embryo to maturation in crabs were investigated. Furthermore, the synthetic and recombinant peptides of hecpidin and scygonadin are confirmed to be potent active against Gram positive bacteria, Gram negative bacteria and fungi. Based on the developed appropriate methods for producing large quantities of AMPs using gene engineering techniques and combining with the strong antimicrobial activity these AMPs are potential to be used in veterinary medicine and aquaculture.

Key words: marine fish; Mud Crab; antimicrobial peptides; hecpidin; scygonadin; gene cloning; gene expression pattern; antimicrobial activity; marine aquaculture