

研究论文

抗菌肽Aoattacin可促进小鼠烫伤创面的愈合

刘流¹ 刘晖¹ 王莉君² 贺莉芳³ 李晓飞¹ 曹建平⁴ 郑明辉^{1,4*}¹遵义医科大学, 遵义 563003; ²遵义医科大学医学与科技学院, 遵义 563003;³黔南民族医学高等专科学校, 贵州 558000; ⁴中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 上海 200025)

摘要 该文旨在研究抗菌肽Aoattacin对皮肤烫伤模型小鼠创伤愈合的影响。采用重组杆状病毒表达系统在昆虫sf9细胞中对Aoattacin蛋白进行表达和纯化, 并通过构建深II度烧伤小鼠模型来检测其对烧伤创面愈合的影响: 实验组滴注抗菌肽1次/天(25 mg/L), 以PBS(30 mg/L)为阴性对照, 磺胺嘧啶银(10 mg/L)为阳性对照。通过测量烫伤后皮肤损伤面积计算伤口愈合率(第7、14、21天), 同时取小鼠烫伤处和周边皮肤进行HE染色, 通过形态学变化分析创面病理组织结构并利用免疫组化测定EGF、bFGF变化情况。文中表达、纯化了具有抑菌活性的抗菌肽Aoattacin, 伤后7天和对照组相比, 抗菌肽组小鼠创面菌落数减少, 差异显著($P<0.01$); 抗菌肽组小鼠损伤皮肤愈合率高于对照组($P<0.05$), 这与其可降低炎症反应(低中性粒细胞和巨噬细胞浸润和促炎细胞因子水平)有关。与对照组相比, 抗菌肽组的小鼠创面新生组织的毛细血管、成纤维细胞数量均有增多, 14、21天时组织分层明显; 抗菌肽组的EGF、bFGF表达在两个时间点明显超过对照组($P<0.05$)。结果表明, 抗菌肽Aoattacin可抑制模型小鼠的创面感染、对创面愈合及修复过程都有促进作用, 具有开发成为烧伤药物的潜力。

关键词 抗菌肽; 真核表达; 小鼠烫伤模型; 烧伤创面

The Antimicrobial Peptide Aoattacin can Promote the Wound Healing on Burn Wound Mice

LIU Liu¹, LIU Hui¹, WANG Lijun², HE Lifang³, LI Xiaofei¹, CAO Jianping⁴, ZHENG Minghui^{1,4*}¹Zunyi Medical University, Zunyi 563003, China; ²Medicine & Technology School of Zunyi Medical University,Zunyi 563003, China; ³Qiannan Medical College for Nationalities, Guizhou 558000, China;⁴National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200025, China)

Abstract To study and test the therapeutic effect of antimicrobial peptide Aoattacin on scald infection of model mice, it was expressed and purified with Bac-to-Bac system expression system in insect cell sf9, and the II degree burns infection model to detect the healing of burn wounds mouse were established. Experiment group was treated with antimicrobial peptide once a day (25 mg/L), and the negative control group was treated with PBS (30 mg/L), while Silver Sulfadiazine (10 mg/L) is positive control group. Wound healing rate was calculated by measuring the area of skin lesions after burns (days 7, 14, 21). Wound and surrounding skin were taken for HE

收稿日期: 2021-12-23 接受日期: 2022-04-06

国家自然科学基金(批准号: 81560336、31960025)、中国博士后科学基金(批准号: 2019M650799)和贵州省科技厅科学技术基金(批准号: 黔科合基础(2016) 1168)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18198314105, E-mail: ivying0209@hotmail.com

Received: December 23, 2021 Accepted: April 6, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81560336, 31960025), the China Postdoctoral Science Foundation (Grant No.2019M650799), and the Science and Technology Fund from the Guizhou Province Technology Hall (Grant No.Qiankehejichu (2016) 1168)

*Corresponding author. Tel: +86-18198314105, E-mail: ivying0209@hotmail.com

staining, and the wound pathological changes were observed to analyze the pathological tissue structure of wound, and expression change in EGF and bFGF was measured by immunohistochemistry methods. The results showed that antimicrobial peptide Aoattacin was successfully expressed and purified with important antibacterial activities. Seven days after burning injury, compared to control group, the colony count (CFU) of the wound surface in antimicrobial peptide mouse had a remarkable reduce ($P < 0.01$) and healing rate had a significant increase in the antimicrobial peptide group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the number of capillaries and fibroblasts in the wound tissue of the antibacterial peptide group increased. Organizational layering is obvious at 14 and 21 days. The expression of EGF and bFGF in the antimicrobial peptide group was significantly higher than that in the control group at each time point ($P < 0.05$). The results showed that the antimicrobial peptide Aoattacin could inhibit burn wound infection and promote wound healing in mice, which thereby promoted the repair process of wounds, and indicated that Aoattacin had the potential to be developed into a drug for treating burns.

Keywords antimicrobial peptide; eukaryotic expression; mouse scald model; burn wound

烧伤、烫伤都是最常见的皮肤创伤性疾病。创面细菌感染贯穿患者治疗的全过程,而抗生素引起的耐药菌感染及二重感染若不能及时治疗会造成严重后果,甚至患者会出现败血症^[1]。

抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)是一类分子量小、稳定性好、抗菌谱广且抑菌活性强的内源性多肽分子,大多为阳离子型,包含100多个L-氨基酸残基的线性或圆形寡肽,可形成二级空间结构,其氨基酸序列不尽相同^[2-4]。研究发现,抗菌肽不仅对多种细菌有很强的杀伤活性,对各种真菌、病毒及寄生原虫也有很好的抑菌活性,其又被称作“天然抗生素”,具有普通抗生素不具备的多个优点^[5-6]。然而,抗菌肽的这种抑菌机理尚不清晰。但大多数观点认为,抗菌肽主要作用在病原菌的细胞膜上,二者相互作用后,通过破坏细胞膜的结构及改变膜通透性来发挥灭菌效应^[7]。但至今为止,以抗菌肽作为药物在体内的作用研究并不多。

蝇类通常喜爱腐烂、潮湿的环境,非常容易感染多种病原菌,但其生存能力却很强大,这主要是因为其体内强大的先天免疫系统能够抵御多种病原微生物的入侵^[8]。而抗菌肽作为体液免疫的关键因子,在先天免疫中发挥重要作用^[9]。家蝇(*Musca domestica*)抗菌肽的研究一直受到人们的广泛关注^[10]。据报道,目前在家蝇中已鉴定出不同种类的抗菌肽分子,如: Diptericin^[11]、Attacin、Defensin^[12]、Muscin和Cecropin^[13]等。陈曼等^[14]利用金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)诱导家蝇幼虫验证了抗菌肽的活性,同时本实验室也对家蝇的抗菌肽的生物活性进行了部分鉴定^[15-17];随后又结合冈田绕眼果蝇

(*Phortica okadai*)的差异表达文库筛选出其中显著表达的Attacin基因。通过昆虫细胞sf9真核表达系统成功表达后,研究人员发现,冈田绕眼果蝇对金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)及铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)等均有抗菌活性^[18]。

冈田绕眼果蝇作为一种果蝇不仅携带成百上千种病菌,还能够作为结膜吸吮线虫(*Thelazia callipaeda*)的重要中间宿主,传播引起人兽共患眼病—结膜吸吮线虫病(Thelaziasis)^[19-20]。我们从本实验室构建的冈田绕眼果蝇转录组文库及细菌诱导的差异表达谱文库中(未发表数据)通过表达量筛选、定量验证等方法鉴定到多个和家蝇抗菌肽同源的Unigene,将其命名为Aoattacin。前期的抗菌实验证实了高表达的Aoattacin对多种细菌和真菌均有一定的抑制作用,其中Aoattacin对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌等耐药菌有较强的抑菌活性^[18]。故我们推测Aoattacin在治疗烧伤引起的创面细菌感染中会起到一定作用,对细菌感染引起的炎症反应起到调节作用。此外,虽然许多治疗剂包括生长因子,如:表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)^[21]和人生长激素(recombinant human growth hormone, rhGH)^[22]已成功应用于临床,但因其生产成本昂贵而不利于被普及^[14,23]。而抗菌剂如磺胺嘧啶银/碘或医用级蜂蜜已被掺入敷料中,作为避免伤口感染的一种方法。但是,许多研究表明单独使用这些药剂对伤口的愈合效果并不佳。在某些条件下,可能还会出现毒性问题。同时,近年来抗菌肽在烧伤治疗中的作用机制的研究也越来越多^[24-26]。

因此, 本研究利用已经构建的真核表达体系^[18]对前期转录组数据中筛选到的*Aoattacin*基因进行了表达; 同时构建了小鼠的烫伤感染模型(II度), 利用前述表达的Aoattacin进一步对其施以治疗, 从而初步探索Aoattacin在模型小鼠创面愈合中的作用及其可能的机制, 尤其是其对I型胶原蛋白(Collagen I)、EGF及碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)表达的影响, 并将其与临床上传统用药相比, 评价抗菌肽的功效, 为进一步的研究和临床应用提供有益参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 冈田绕眼果蝇由本实验室保种饲养^[19]。实验动物: 清洁级昆明小鼠[雌雄各半、体质量约(20±2) g]由重庆医科大学实验动物中心提供(伦理审查批准号: 遵医伦审(2021) 1-038号)。所有实验均在遵义医科大学-贵州省普通高等学校传染病与生物安全特色重点实验室(BSL-2)完成。

1.1.2 主要试剂 铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)由遵义医科大学微生物学教研室宋鸿教授提供。*Bam*H I酶、*Hind* III酶、sf9细胞、质粒pFastBac1、*E. coli* DH10Bac感受态细胞均由本课题组保存。BCA试剂盒、TEV蛋白酶、Mouse Anti-His Tag单克隆抗体、水合氯醛及硫化钠购自德国Sigma公司; DC蛋白质测定试剂盒购自美国Bio-Rad公司; 兔抗人bFGF单克隆抗体购自美国Abcam公司。*Aoattacin*基因由成都擎科生物技术有限公司合成。对照组的磺胺嘧啶银由昆明圣火药业有限公司生产。其余试剂(分析纯度)均购自国药集团化学试剂公司。

1.2 方法

1.2.1 抗菌肽Aoattacin基因的验证 对筛选的高表达基因*Aoattacin*进行PCR扩增电泳实验验证后, 对该基因的密码子进行优化, 分别在5'和3'端添加*Bam*H I和*Hind* III酶切位点, 并在C-端添加His标签, 进行全基因合成, 并将合成的序列与验证的序列进行比对。分别用*Bam*H I和*Hind* III限制性内切酶双酶切后, 16 °C过夜, 以实现*Aoattacin*基因与pFastBac1载体的连接, 经过PCR电泳扩增和双酶切验证后, 利用本实验室前期构建的真核表达体系pFastBac1-*Aoattacin*进行细胞转染及P1、P2代病毒扩增^[18]: 在6孔板中加入2 mL Sf-900™ IISFM培养基, 接种P2代病毒后生长到对数期,

制备Bacmid复合物, 用Sf-900™ IISFM(无抗生素)培养基稀释后, 加到每个孔中, 27 °C孵育5 h, 吸出培养液, 加入Sf-900™ IISFM含抗生素的培养基, 28 °C孵育72 h, 经4 °C、12 000 r/min离心5 min收集上清, 即为P1代病毒液(1×10^6 pfu/mL)。继续扩增低浓度的P1毒株到P2代病毒($1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ pfu/mL), 用于*Aoattacin*的表达。

1.2.2 抗菌肽Aoattacin基因的表达、纯化 接种活力>95%的sf9细胞 2×10^6 个至200 mL摇菌瓶, 待细胞生长至对数期, 加入P2杆状病毒液(1:100), 28 °C孵育72 h后离心(500 r/min, 5 min)收集上清和沉淀物(按照昆虫蛋白提取试剂盒说明书操作)。镍柱亲和层析(Ni-NTA柱)纯化目的蛋白后, 对抗菌肽进行SDS-PAGE分析和Western blot鉴定, 并用ABSciex 4800 plus质谱仪分析纯化后的Aoattacin蛋白。

1.2.3 去除His标签及抑菌活性检测 按照TEV蛋白酶说明书操作, 反应体系如下: 0.1 mg Aoattacin、10 μL 10× 缓冲液、20 U的TEV蛋白酶, 加至总体积为100 μL的反应体积, 4 °C酶切12 h。酶切后二次亲和层析(His-Trap FF), 洗脱液收集后进行透析、冻干, 得到Aoattacin干粉。阴性对照采用0.1 mol/L PBS, 管碟法检测不同浓度(10、15、25 mg/L) Aoattacin对铜绿假单胞菌的抑菌活性。

1.2.4 深II度烧伤模型的建立及给药处理方式 将36只小鼠随机平均分成3组: PBS对照组(阴性对照组)、磺胺嘧啶银组(阳性对照组)和抗菌肽组(处理组)。在小鼠腹腔注射10%的水合氯醛溶液进行麻醉, 俯卧位固定小鼠, 用10%的硫化钠除去背毛, 面积约为3 cm×3 cm, 并用清水洗净; 将电烙铁置于95 °C的电热恒温水浴锅中煮沸约30 min, 迅速取出, 无压力置于小鼠背部腰椎正中的左右两侧烫取创面各一个, 重复3次, 病理切片证实为深II度烫伤^[27], 两相邻创面相距1.5 cm。其中一个创面涂抹铜绿假单胞菌0.05 mL(1×10^8 CFU/mL), 构建铜绿假单胞菌感染模型^[28]。烫伤模型建立后, 分别在小鼠的创口处均匀滴加0.05 mL的Aoattacin(25 mg/L), 对照组采用0.05 mL的PBS、磺胺嘧啶银(10 mg/L)分别进行滴注, 5 min后对创面进行处理并用灭菌纱布包扎, 每个实验组1次/天进行给药, 至伤后21天(根据说明书及预实验结果选择最佳用药剂量)。

1.2.5 Aoattacin促进烫伤功能检测 (1) 抑菌功能测定: 分别于烫伤后第7、14、21天, 每组各取3只小

鼠采用脱臼法将其处死。在无菌环境下操作,取下创面组织(约1 g表层组织),称重后加入1 mL等渗盐水后对组织匀浆处理和倍比稀释,再将其接种到LB固体培养平板上,置于37 °C恒温箱中孵育24 h。菌落形成单位(colony-forming units, CFU)通过平板菌落数计算。含菌量(CFU/g)=单菌落数×稀释倍数/组织体质量(g)。

(2) 创面愈合率测定:在给药后的第3、7、14、21天,愈合中的创面用卷尺按照横长(r1)和纵长(r2)分别测量其大小,根据面积公式计算创面面积,并根据创面愈合率(%)=(给药前面积-给药后面积)/给药前面积×100%计算。

(3) 创面组织观察:取烫伤创面组织边缘的样品,用4%的甲醛固定溶液固定24 h后,将组织样品置于不同梯度浓度的乙醇和二甲苯溶液进行处理,包埋在石蜡中,并以4~10 μm的厚度切割。然后,将切片再水合并用苏木素-伊红(Hematoxylin-eosin, HE)、吉姆萨(Giemsa)和马松三色(Masson Trichrome)染色后用于组织学分析。

(4) 炎症调节作用(细胞因子的表达检测):将烧伤创面组织在4 °C下在RIPA缓冲液中匀浆5 min提取蛋白。总蛋白采用DC蛋白质测定试剂盒和ProcartaPlex™ Multiplex免疫测定法进行。单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、人生长调节致癌基因α(Gro-α, Gro-α)、血管内皮生长因子(VEGF)和IL-10的水平使用Luminex™ 200进行定量(Millipore)。而TGF-β使用酶联免疫吸附实验(ELISA)测定试剂盒测定(R&D Systems)。

(5) EGF、bFGF含量检测:用药后第7、14、21天分别从每组取损伤组织处皮肤,从免疫组化染色切片中随机选取3个视野。通过细胞遗传工作站(LEICA Q550CW)的图像采集与分析系统对阳性细胞的平均灰度值进行测量,来反映伤口皮肤的EGF、bFGF的表达量^[29]。灰度值越低,表示免疫组化染色越深,免疫反应性越强。

(6) 促进EGF、bFGF分泌作用:对组织进行切片包埋,HE染色后50 °C下烘烤2 h。脱蜡水洗,在柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)中煮沸4 min实现抗原修复。自然冷却后,使用3%的过氧化氢溶液阻断过氧化物酶活性10 min。随后用PBS(pH7.6)洗3次。将切片与一抗(1:500,15 μg/mL)孵育(37 °C)1 h,再用PBS洗涤3次。在室温下与二抗(1:3 000,5 μg/mL)孵育15 min后PBS洗涤3次^[29]。最后,与苏木精对比后,用

二氨基联苯胺溶液孵育5 min,显色。抗体分别为抗EGF抗体和抗bFGF抗体。

(7) 对Collagen I表达的影响:取伤后第1、3、7、14、21天抗菌肽组小鼠烫伤处皮肤总蛋白,35 μg总蛋白利用Western blot检测I型胶原蛋白表达情况[SDS-PAGE,转膜(电转时间200 mA,1 h),用3% BSA封闭液4 °C封闭过夜,加入稀释比例为1:1 000的抗体后在4 °C摇床上孵育过夜,ECL发光和曝光];相同方法检测小鼠伤后第7天时的Collagen I的表达,通过ImageJ软件对结果进行灰度值分析。最后通过ELISA(参照Mouse collagen Type I kit)操作方法进一步进行检测。

1.2.6 统计学分析 实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS 21.0软件进行分析($P < 0.05$ 表示有差异; $P < 0.01$ 表示有显著性差异)。

2 结果

2.1 *Aoattacin*基因验证及载体构建

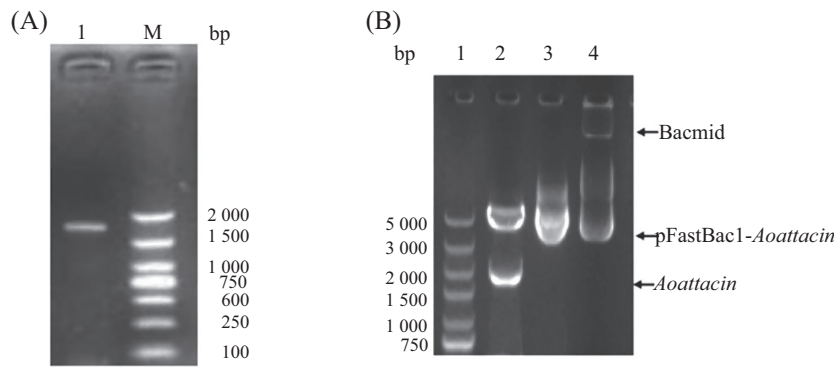
对*Aoattacin*基因进行PCR检测,获得的条带长度约为1 900 bp(图1A)。重组质粒经BamH I和Hind III双酶切后,再经电泳PCR鉴定,出现长度约为1 900 bp的目的基因和5 000 bp左右的质粒条带(图1B)。将pFastBac1-*Aoattacin*转化入*E. coli* DH10Bac感受态细胞进行扩增,获得重组Bacmid。酶切鉴定后,重组杆粒含有pFastBac1-*Aoattacin*载体并证实杆粒中发生了正确的同源重组。提取重组Bacmid,与理论值一致,说明重组Bacmid构建成功(图1B)。

2.2 *Aoattacin*的表达及活性检测

构建成功的载体通过病毒转染sf9细胞诱导表达后先用SDS-PAGE对蛋白质的纯度(95%)和分子量(7.9 kDa)进行检测,蛋白质表达后再进行Western blot检测重组蛋白是否表达。对重组冈田绕眼果蝇*Aoattacin*蛋白进行质谱分析,结果用Mascot检索比对如图2C所示,质谱鉴定两条多肽与测序数据库中*Aoattacin*蛋白氨基酸序列完全匹配。经BCA试剂盒定量,最终获得纯化后的*Aoattacin*蛋白浓度为7.5 mg/mL。利用鼠单克隆抗体(抗His标签)进行Western blot鉴定,除去His标签后检测其抑菌活性。结果发现,*Aoattacin*对铜绿假单胞菌有很好的抑菌效果,并且抑菌活性与浓度呈正相关(图2E)。

2.3 *Aoattacin*对模型小鼠创面的抑菌功能

在给药处理的开始(0天)和第3天,三组间无显

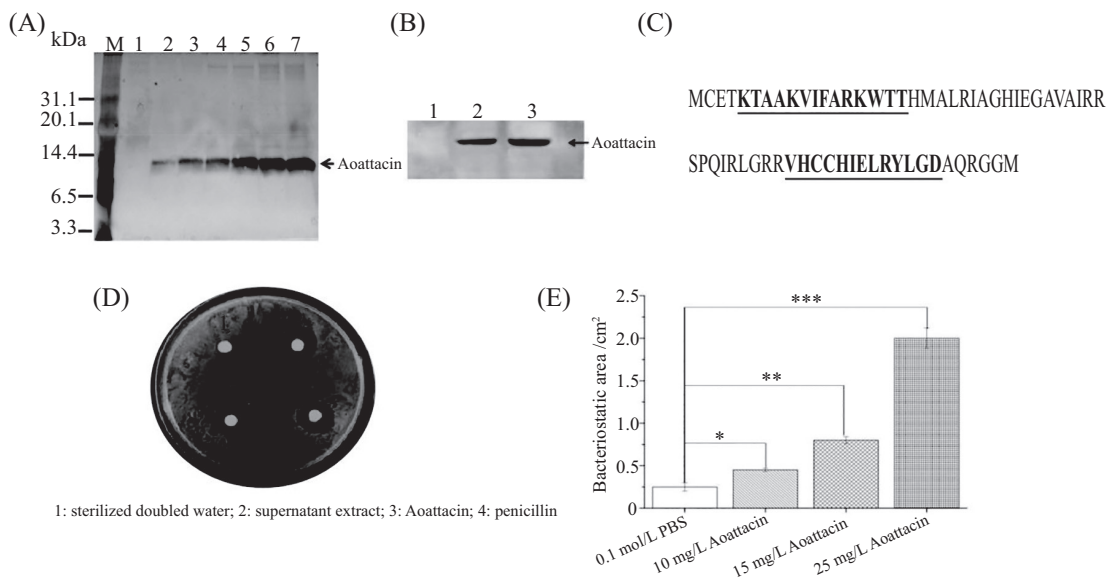


A: M, 2 Kb DNA分子标记; 泳道1, Aoattacin。B: 泳道1, 5 Kb DNA分子标记; 泳道2, 经*Bam*H I和*Hind* III限制性内切酶酶切后的pFastBac1-Aoattacin载体; 泳道3, pFastBac1-Aoattacin载体; 泳道4, 含有pFastBac 1-Aoattacin载体的重组杆粒。

A: M, 2 Kb DNA Marker; lane 1, Aoattacin。B: lane 1, 5 Kb DNA Marker; lane 2, pFastBac1-Aoattacin vector digested by *Bam*H I and *Hind* III restriction enzymes; Lane 3, pFastBac 1-Aoattacin vector; lane 4: the recombinant bacmid containing the pFastBac 1-Aoattacin vector.

图1 *Aoattacin*基因及重组Bacmid载体的验证

Fig.1 Validation of *Aoattacin* gene and recombinant Bacmid vector



A: *Aoattacin*在不同时间段的SDS-PAGE分析。M: 蛋白质标记; 泳道1~7: 分别诱导0、24、48、72、96、120、144 h后的培养上清液(18 μ L)。B: 蛋白质印迹分析Aoattacin杆状病毒的表达。泳道1: 阴性对照; 泳道2: Aoattacin; 泳道3: 阳性对照。C: Mascot质谱鉴定Aoattacin的结果比较。D: Aoattacin的体外抑菌实验。E: Aoattacin抗菌作用的剂量反应曲线。* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001。

A: SDS-PAGE analysis of *Aoattacin* at different time periods. M: protein marker; lanes 1-7: the culture supernatants (18 μ L) at 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 h post induction, respectively. B: Western blot analysis of baculovirus expression of *Aoattacin*. Lane 1: negative control; lane 2: *Aoattacin*; lane 3: positive control. C: comparison of *aoattacin* results identified by Mascot mass spectrometry. D: bacteriostasis experiment of *Aoattacin* *in vitro*. E: the dose-response curve of *Aoattacin* antibacterial effect. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001.

图2 SDS-PAGE分析Aoattacin蛋白的诱导表达、纯化及抑菌活性检测

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the induced expression, purification and antibacterial activity of *Aoattacin* protein

著性差异。在给药后的14天和21天, 抗菌肽组小鼠创面菌落数明显降低, 与PBS组有显著差异(P <0.01), 但与磺胺嘧啶银组无显著差异(P >0.05)(图3)。

2.4 *Aoattacin*对伤口愈合的影响

在给药处理后的第3天, 三组间无显著性差异(P >0.05); 在第7、14、21天时, 抗菌肽组与PBS组比

较创面愈合率有显著性差异(P <0.01); 在21天时, 抗菌肽组的愈合率达到93.2%, 与磺胺嘧啶银组无显著性差异(P >0.05)(图4)。

2.5 皮肤组织病理学观察及对Collagen I的影响

Collagen I表达的影响: 在给药期间内, *Aoattacin*组的小鼠伤处皮肤的Collagen I表达与用药时间呈正相关

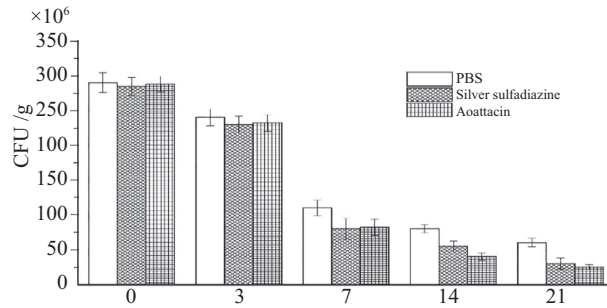
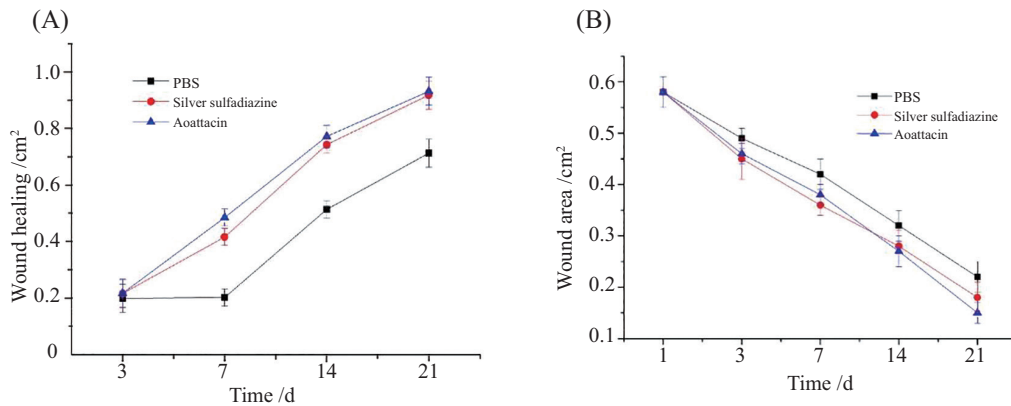


图3 Aoattacin对烫伤小鼠皮肤细菌数量的影响

Fig.3 Effect of Aoattacin on burned skin bacterial count of model mice



A: 创面愈合趋势; B: 伤口面积趋势。n=12。

A: trend of wound healing; B: trend of wound area. n=12.

图4 Aoattacin对烫伤模型小鼠皮肤创面愈合的影响

Fig.4 Effect of Aoattacin on skin wound healing in model mice

(图5B和图5C)。结果表明, 抗菌肽Aoattacin可能通过促进胶原蛋白表达从而加速对小鼠皮肤创面修复的过程。通过Western blot检测烫伤皮肤组织在第7天时Collagen I的表达情况(图5A), 与PBS组相比, Collagen I在Aoattacin组、磺胺嘧啶银组均显著上调($P<0.001$)。

组织切片观察: 利用马松三染色法进一步观察胶原蛋白的形成情况。结果显示, 胶原层的形成在感染伤口处完全被破坏, 可以增强伤口周围胶原蛋白的形成区域(图6)。另外, Aoattacin在处理伤口胶原蛋白的形成效率方面也优于对照组。

免疫调节功能: 对中性粒细胞和单核细胞趋化性因子进行评估, Aoattacin处理组在伤后的第3天, Gro- α 显著降低(图7A); 而Aoattacin处理组的MCP-1在第3天时亦显著降低, 并持续到第12天(图7B); VEGF的表达在各个组都逐渐升高, 表达差异主要在第1天和第18天(图7C); IL-10在烧伤创面早期阶段增加, 在第7天左右恢复到基线水平(图7D); TGF- β 在第1天时, 对照组的表达增加比烧伤后1 h观察到的值

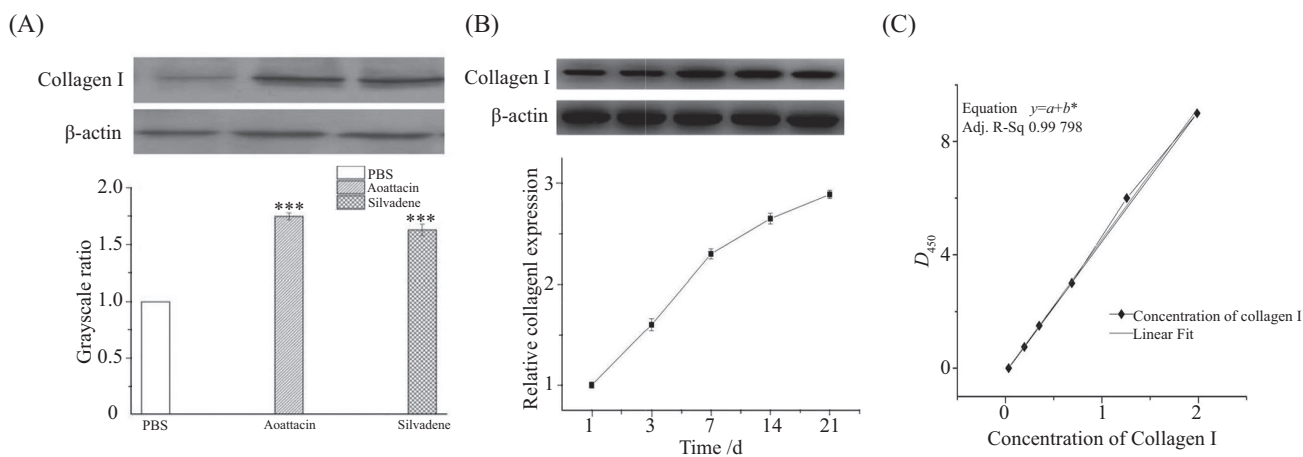
更高, Aoattacin处理后的组织水平显著降低, 而第18天时刚好相反, 组织中的TGF- β 的浓度在抗菌肽处理组的组织中显著升高(图7E)。

对EGF、bFGF表达的影响: 在第3、7天时, 实验组EGF的表达未见明显变化, 而在第14天时表达增高, 21天时的EGF又恢复到正常水平(图8A); 实验组EGF的总体灰度值低于对照组, 即EGF总体表达高于对照组; bFGF在第3、7天时未有明显变化, 在第14、21天时表达水平增高($P<0.05$)(图8B)。实验组bFGF的总体灰度值低于对照组, 即bFGF的总体表达水平高于对照组。

对EGF、bFGF分泌的影响: 与对照组相比, 阳性组和模型组中烧伤组织的EGF与bFGF无明显变化。但Aoattacin分别经15 mg/L、25 mg/L两个处理浓度后, EGF和bFGF表达量均增加(图9和表1)。

3 讨论

烫伤、烧伤等严重时会导致创面感染等并发症,

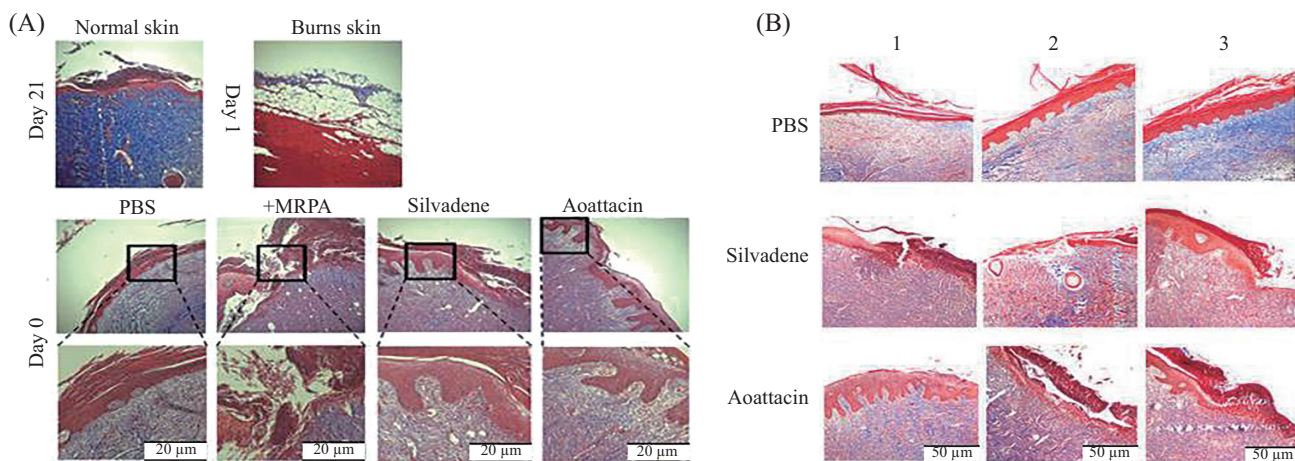


A: 蛋白质印迹法分析7天后I型胶原蛋白的表达(** $P < 0.001$, 与PBS组相比)。B: 蛋白质印迹法分析21天后I型胶原蛋白的表达。C: 酶联免疫吸附法测定抗I型胶原蛋白自身抗体的血清水平。

A: the results of type I Collagen expression analysis after 7 days by Western blot (** $P < 0.001$ compared with PBS group). B: the results of type I Collagen expression analysis after 21 days by Western blot. C: the serum levels of anti-collagen I autoantibodies measured by enzyme-linked immunosorbent assay.

图5 给药的不同时期皮肤创面I型胶原蛋白的表达

Fig.5 The expression of type I Collagen on skin wounds during different periods of administration



A: Aoattacin治疗的伤口显示胶原层沉积有所改善。B: Aoattacin处理的样品中胶原层的沉积比用当前阳性对照silvadene处理的样品有所改善。A: the Aoattacin-treated wounds showed an improvement in the deposition of the collagen layer. B: the deposition of the collagen layer in the Aoattacin-treated samples was improved to the samples treated with the currently positive control silvadene.

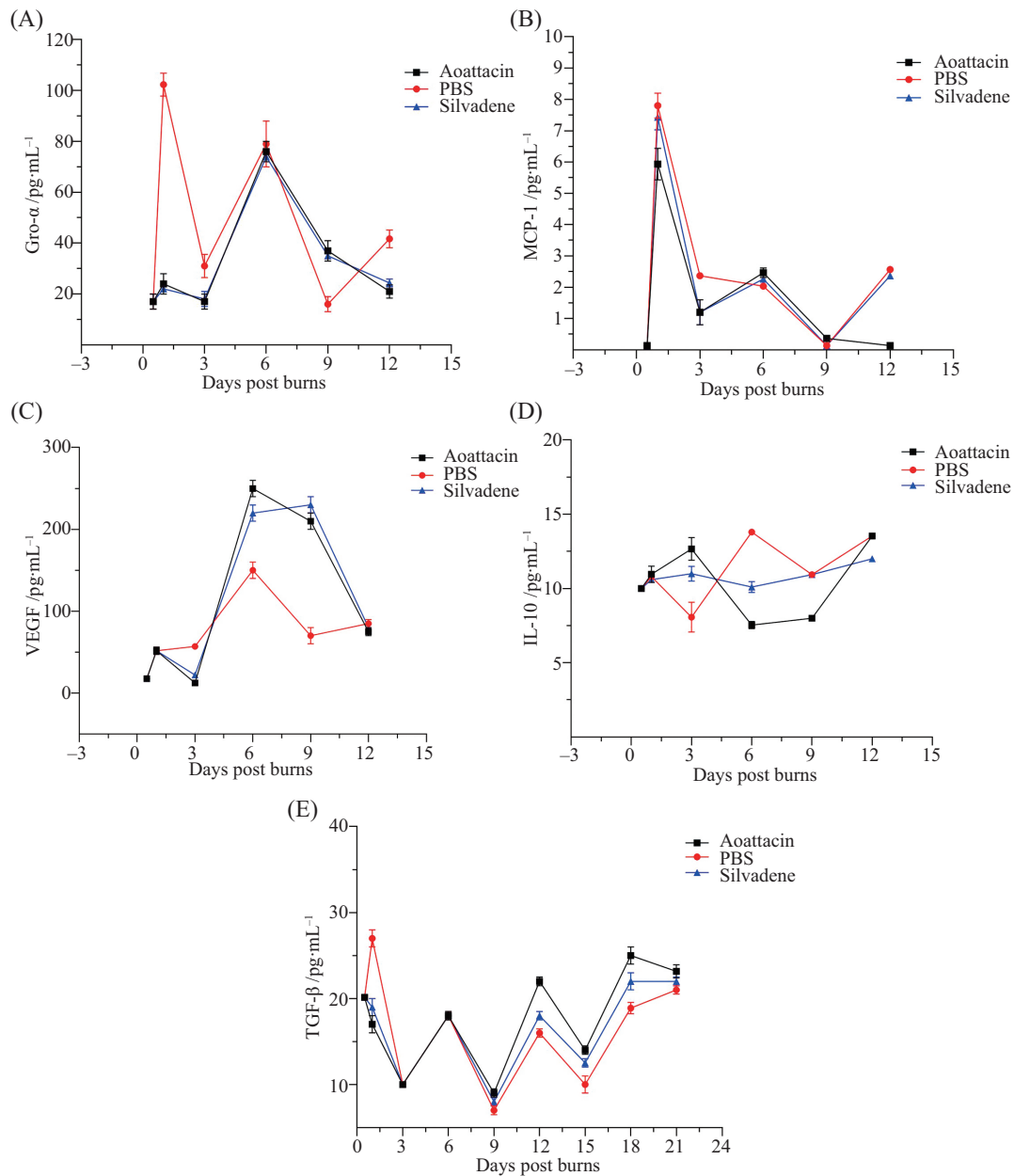
图6 Aoattacin处理增强伤口愈合部位I型胶原蛋白形成

Fig.6 Aoattacin-treatment enhances the formation of collagen structures at the healing wound site

而抗生素的过度使用也导致了多数病原菌的耐药性逐年上升^[30]。解决细菌抗药性的主要途径之一是寻找新型抗菌类药物。而近年来被广泛研究的抗菌肽是一种具有较好开发前景的多肽分子, 具有传统抗生素无法比拟的优势。如抗菌肽Daptomycin已被应用于临床治疗及生物医药开发等领域^[31-32]。

本课题组前期筛选了家蝇Attacin基因并构建了其真核表达系统, 对成功表达的Attacin蛋白抗菌功能进行了验证^[18]。同时也利用化学合成法获得本研究

中的抗菌肽Aoattacin蛋白, 并对其进行了抑菌活性检测, 结果发现其对大多数细菌, 如: 鸡伤寒沙门氏菌(*Salmonella gullinarum*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和稳定伯克霍尔德菌(*Burkholderia stabilis*)的抑菌效果较差, 且最小抑菌浓度(MIC)均 $> 100 \mu\text{mol/L}$ (未发表数据), 这与先前通过真核表达系统纯化的Aoattacin蛋白的抑菌效果相反, 我们发现后者具有明显的抗菌活性, 这说明合成的Aoattacin蛋白不如纯化表达的Aoattacin蛋白的抗菌谱广。此外, 我们还发现



A: Gro- α 是一种趋化性中性粒细胞的细胞因子。B: 单核细胞趋化蛋白(MCP-1)招募单核细胞, 然后在组织中分化为巨噬细胞。C: 血管内皮生长因子(VEGF)刺激血管生成。D: 白细胞介素-10(IL-10)是一种抗炎细胞因子。E: 转化生长因子- β (TGF- β), 匀浆中的TGF- β 水平使用ELISA法测定。

A: Gro- α , which is a cytokine that chemoattracts neutrophils. B: monocyte chemoattractant protein (MCP-1), which recruits monocytes and then differentiate into macrophages in the tissue. C: vascular endothelial growth factor (VEGF), which stimulates the angiogenesis. D: interleukin-10 (IL-10), an anti-inflammatory cytokine. E: transforming growth factor-beta (TGF- β), TGF- β levels in the homogenates were determined using an ELISA assay.

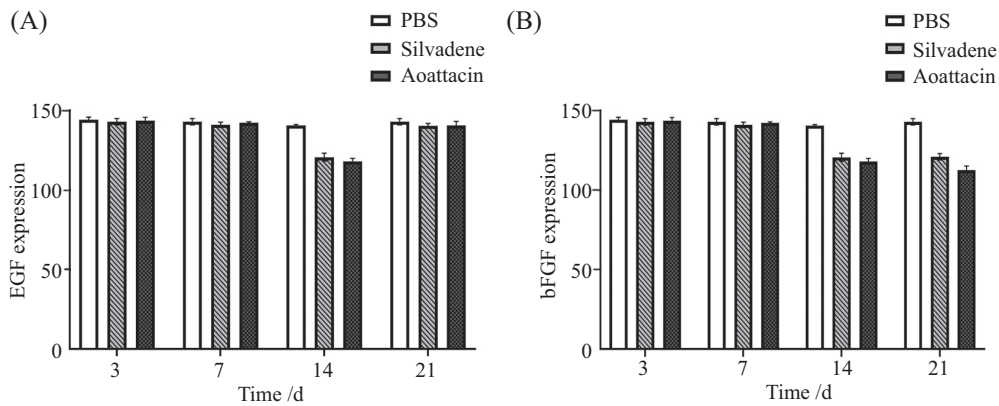
图7 Aoattacin处理烧伤创面后的趋化因子和细胞因子水平

Fig.7 Chemokine and cytokine levels after treatment of the burn wounds with Aoattacin

真核表达的家蝇Attacin^[16-17]和果蝇Aoattacin^[18]对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及铜绿假单胞菌等多种细菌均具有很好的抑菌活性。

基于上述研究, 本文中我们对Aoattacin蛋白在小鼠烫伤创面感染及愈合中的作用进一步研究。致病菌金黄色葡萄球菌和条件致病菌铜绿假单胞菌在

自然环境中分布广泛, 而且抗生素容易产生耐药性, 因此成为烧烫伤感染中的主要致病菌之一^[33]。于是本实验中我们在构建的小鼠II度烫伤感染模型基础上增加了铜绿假单胞菌感染模型, 并通过Aoattacin进行干预治疗, 对创缘菌落、创面组织愈合率及其形态学进行了分析。结果表明, Aoattacin在很大程

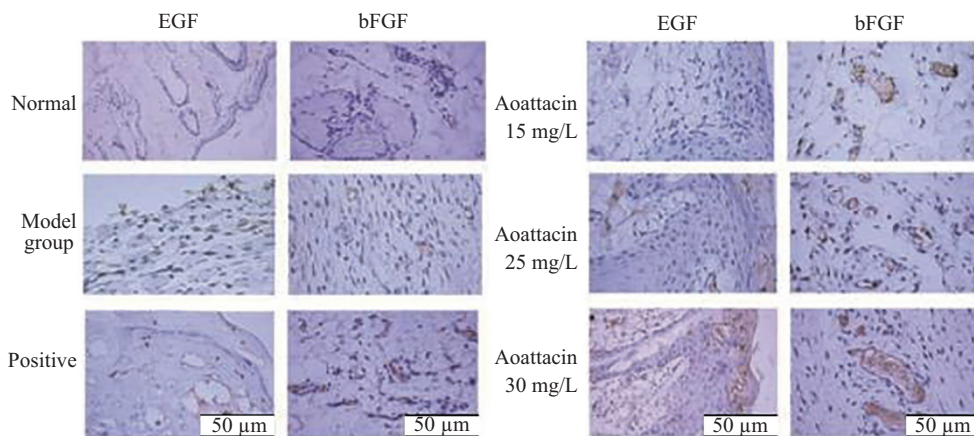


A: 给药不同时期EGF的表达情况; B: 给药不同时期bFGF的表达情况(该图中纵轴代表灰度值, 横轴代表给药时期; 灰度值越低, 表示免疫组化染色越深, 免疫反应性越强, 蛋白表达量越多)。

A: the expression of EGF in different periods after administration; B: the expression of bFGF in different periods after administration (in the figure, the vertical axis represents the gray value and the horizontal axis represents the administration period; the lower the gray value, the deeper the immunohistochemical staining; the stronger the immunoreactivity, and the more protein expression).

图8 给药不同时期EGF和bFGF的表达情况

Fig.8 The expression of EGF and bFGF in different periods after administration



A: 对照组、模型组、阳性组和Aoattacin不同浓度处理后烧伤组织EGF与bFGF的变化; B: 对照组、模型组、阳性组和Aoattacin不同浓度处理后烧伤组织EGF与bFGF的表达量。

A: the changes of EGF and bFGF in burn tissues after treatment with different concentrations of Aoattacin in the control group, model group, positive group and Aoattacin; B: the expression of EGF and bFGF in burn tissues after treatment with different concentrations of control group, model group, positive group and Aoattacin.

图9 免疫组化法检测1天时EGF和bFGF的表达

Fig.9 The expression of EGF and bFGF at 1 day was detected by immunohistochemistry

表1 对照组、模型组、阳性组和Aoattacin不同浓度处理后烧伤组织EGF与bFGF的表达量

Table 1 The expression of EGF and bFGF in burn tissues after treatment with different concentrations of control group, model group, positive group and Aoattacin

治疗 Treatment	EGF /ng·mL ⁻¹	bFGF /ng·mL ⁻¹
Model	305.81±15.52	100.29±7.42
Aoattacin (15 mg/L)	314.39±10.18	110.07±1.35
Aoattacin (25 mg/L)	321.27±7.20	111.40±3.53
Aoattacin (30 mg/L)	307.98±10.03	101.98±4.38
Positive	318.17±8.07	102.89±4.19
Normal	299.49±16.28	101.47±3.42

度上减少了模型小鼠烫伤后创面的愈合时间,并在伤后7天时,实验组小鼠创面的愈合率与对照组相比显著升高($P<0.01$)。我们推测这可能与Aoattacin分子促进EGF的分泌有关。根据已有文献报道,创伤局部应用EGF并结合包扎治疗能有效促进创面愈合^[34]。但在3天和7天时,EGF和bFGF的表达增高不明显,具体原因不详,我们推测这和抗菌肽作用的药物浓度/动力学效应有关。药物处理7天时,抗菌肽组中的小鼠烫伤创面的菌落数明显低于对照组($P<0.01$),这个实验结果说明Aoattacin可以抑制创面的细菌生长(图3)。这很可能与Aoattacin的抗菌功能有关,同时也和我们前期家蝇抗菌肽Attacin的抗菌实验结果相吻合。

创面的愈合是一个复杂的过程,涉及到机体局部及全身免疫防御,细胞组织再生及重建过程。因此,本文通过检测Aoattacin治疗烧伤创面后的几种趋化因子和细胞因子的变化初步分析其免疫调节作用。实验数据表明,Aoattacin蛋白处理后的最初几天诱导了Gro- α 、中性粒细胞和MCP-1的低水平表达(图7)。已知促炎细胞因子MCP-1可以在伤口部位募集并分化为巨噬细胞的单核细胞;而我们的数据表明,Aoattacin可在早期募集M2型巨噬细胞,M2型巨噬细胞促使伤口尽快度过炎症阶段,另外M2型巨噬细胞的偏移也被认为和血管再生的促进有关;此外,本文数据显示VEGF表达水平的增加与伤口面积的减少相吻合,表明Aoattacin刺激对血管生成的重要性及其对伤口愈合的加速。已知VEGF为血管生成和血管通透性的最重要刺激剂之一,其在烧伤缺氧环境中由巨噬细胞产生,刺激内皮细胞迁移和扩散^[35-36]。

另外,已知胶原蛋白(I、III型)的表达在皮肤创面愈合过程中发挥重要作用^[37]。故我们针对小鼠创面皮肤I型胶原蛋白的表达进行了分析。结果发现,经抗菌肽处理过的小鼠烫伤处创面皮肤中I型胶原的表达量随时间增加逐渐上升;相比对照组,抗菌肽组小鼠在伤后7天时,伤口皮肤的I型胶原蛋白的表达量呈显著增加趋势。

原因如前述实验中显示的可能与Aoattacin通过刺激细胞分泌一些细胞因子,如表皮生长因子(EGF)有关。目前已知EGF可以加速上皮的再生,促进胶原蛋白合成,并且刺激血管生成。此外,研究结果还发现碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)蛋白阳性表达在伤后14、21天明显高于对照组,这表明Aoattacin

能够促进bFGF的合成和分泌。此外,我们还发现抗菌肽组的创面愈合率在时间上与EGF和bFGF的表达量同步增加。有意思的是,在7天时胶原蛋白是创面基质组成之一,不仅为创面上皮化提供了支架,而且对小鼠烫伤创面愈合也起到了加快的作用,同时也是基底细胞的增殖和移行的基础。同时这些都在组织切片观察的结果中得到证实:比如Aoattacin处理促进伤口愈合部位I型胶原蛋白形成(图6)。同时,在本研究中发现Aoattacin可以刺激细胞分泌bFGF、EGF(图9),其中EGF又很可能与TGF- β 1有着调节关系,而TGF- β 在组织重构中起到了重要作用,这与我们观察到的愈合伤口瘢痕较少有关。

综上,本研究结果表明,Aoattacin不仅对模型小鼠中的II度烫伤创面的恢复过程具有促进作用,同时也能明显缩短愈合所需时间,并对创面感染的控制有一定作用,这为烫伤型感染药物的研发提供了更多可能。

参考文献 (References)

- [1] 王芳,任振. 临床感染中细菌与抗生素耐药性分析[J]. 当代医学(WANG F, REN Z. Analysis of bacterial and antibiotic resistance in clinical infection [J]. Contemporary Medicine), 2019, 25(22): 184-6.
- [2] 杨红艳,卢奎,杜衡,等. 天蚕素抗菌肽的生物信息学分析[J]. 河南工业大学学报:自然科学版(YANG H Y, LU K, DU H, et al. Bioinformatics analysis of cecropin antibacterial peptide [J]. Journal of Henan University of Technology: Natural Science Edition), 2021, 42(4): 10.
- [3] NARAYANA J L, CHEN J Y. Antimicrobial peptides: possible anti-infective agents [J]. Peptides, 2015, 72: 88-94.
- [4] 孙佳辰,申传安,THAPA R K,等. 促进创面愈合的抗菌肽外用制剂的现状与前景[J]. 中华烧伤杂志(SUN J C, SHEN C A, THAPA R K, et al. Current situation and prospect of antibacterial peptides for external use to promote wound healing [J]. Chinese Journal of Burn), 2021, 37(12): 1.
- [5] RONEVI T, PUIZINA J, TOSSI A. Antimicrobial peptides as anti-infective agents in pre-post-antibiotic era [J]? Int J Mol Sci, 2019, 20(22): 5713.
- [6] 金宝,刘晓萌. 抗菌肽的结构特征、分类、生物活性及运用前景[J]. 江西食品工业(JIN Y B, LIU X M. Structural characteristics, classification, biological activity and application prospect of antimicrobial peptides [J]. Jiangxi Food Industry), 2010(3): 33-6.
- [7] 康媛媛,孟珺,王艳阳,等. 抗菌肽功能特性与作用机制的研究进展[J]. 食品科技(KANG Y Y, MENG J, WANG Y Y, et al. Advances in functional properties and mechanism of action of antimicrobial peptides [J]. Food Technology), 2021, 46(1): 265-70.
- [8] 韩明. 果蝇先天性免疫Toll与Imd信号通路相关基因进化机制研究[D]. 南京:南京师范大学,2014.
- [9] TANAKA H, ISHIBASHI J, FUJITA K, et al. A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori* [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2008, 38(12): 1087-110.

- [10] CHU F, MA H, JIN X. *Musca domestica* cardiovascular and respiratory safety evaluation of larvae low molecular weight peptide in beagle dogs [J]. *Toxicol Mech Methods*, 29(6): 397-402.
- [11] 罗金香, 杨春龙, 吴伟东. 家蝇抗菌肽的研究与应用[J]. 昆虫知识(LUO J X, YANG C L, WU W D. Research and application of antibacterial peptides of *Musca domestica* [J]. *Insect Knowledge*, 2005, 42(3): 235-9.
- [12] LU X, SHEN J, JIN X, et al. Bactericidal activity of *Musca domestica* cecropin (Mdc) on multidrug-resistant clinical isolate of *Escherichia coli* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 95(4): 939-45.
- [13] WANG J X, ZHAO X F, LIANG Y L, et al. Molecular characterization and expression of the antimicrobial peptide defensin from the housefly (*Musca domestica*) [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63(24): 3072-82.
- [14] 陈曼, 胡启飞, 文阳安, 等. 家蝇幼虫抗菌肽对铜绿假单胞菌感染小鼠创面的抗菌活性[J]. 生物技术通报(CHEN M, HU Q F, WEN Y A, et al. Antibacterial activity of antibacterial peptides from housefly larvae against wounds of mice infected with pseudomonas aeruginosa [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2009, 3: 91-4.
- [15] 刘晖, 万启惠, 张曦, 等. 诱导家蝇幼虫抗菌蛋白的提取及动力学研究[J]. 中国公共卫生(LIU H, WAN Q H, ZHANG X, et al. Extraction and kinetics of antibacterial protein from induced housefly larvae [J]. *Public Health in China*, 2004, 20(4): 427-8.
- [16] 王灵军, 王鑫, 贺莉芳, 等. 抗菌肽在家蝇胚胎细胞中的表达及活性测定[J]. 遵义医学院学报(WANG L J, WANG X, HE L F, et al. Expression and activity of antimicrobial peptides in embryonic cells of *Musca domestica* [J]. *Journal of Zunyi Medical College*, 2017, 40(1): 53-8.
- [17] 王鑫. 抗菌肽attacin在家蝇胚胎细胞的表达及生物学活性研究[D]. 遵义: 遵义医学院, 2014.
- [18] 蔡娟, 刘流, 王灵军, 等. 基于转录组测序的冈田绕眼果蝇aoattacin基因筛选及在昆虫细胞中表达、抑菌活性检测[J]. 生物技术通报(CAI J, LIU L, WANG L J, et al. Screening of aoattacin gene of *Drosophila Okada* based on transcriptome sequencing and its expression in insect cells and antimicrobial activity [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(9): 118-24.
- [19] 黄学贵, 张露菲, 王灵军, 等. 贵州省遵义市冈田绕眼果蝇的诱捕、鉴定及人工饲养[J]. 医学动物防制(HUANG X G, ZHANG L F, WANG L J, et al. Trapping, identification and artificial feeding of *Drosophila Okada* in Zunyi city, Guizhou province [J]. *Medical Animal Control*, 2017, 33(7): 765-6,770.
- [20] 郑明辉, 叶昌林, 江楠, 等. 贵州省遵义地区人体结膜吸吮线虫线粒体DNA分析[J]. 中国血吸虫病防治杂志(ZHENG M H, YE C L, JIANG N, et al. Mitochondrial DNA analysis of human conjunctival sucking nematode in Zunyi, Guizhou province [J]. *Chinese Journal of Schistosomiasis Control*, 2017, 29(5): 598-601,614.
- [21] KWON Y B, KIM H W, ROH D H, et al. Topical application of epidermal growth factor accelerates wound healing by myofibroblast proliferation and collagen synthesis in rat [J]. *J Vet Sci*, 2006, 7(2): 105-9.
- [22] LIU Y, PETREACA M, MARTINS-GREEN M. Cell and molecular mechanisms of insulin-induced angiogenesis [J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(11/12): 4492-504.
- [23] HRYNYK M, MARTINS-GREEN M, BARRON A E, et al. Alginate-PEG sponge architecture and role in the design of insulin release dressings [J]. *Biomacromolecules*, 2012, 13(5): 1478-85.
- [24] ZHONG G S, CHENG J C, LIANG Z C, et al. Short synthetic β -sheet antimicrobial peptides for the treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections [J]. *Adv Healthc Mater*, 2017, 6(7): 1601134.
- [25] SILVA J P, DHALL S, GARCIA M, et al. Improved burn wound healing by the antimicrobial peptide LLKKK18 released from conjugates with dextrin embedded in a carbopol gel [J]. *Acta Biomater*, 2015, 26: 249-62.
- [26] HUANG H N, PAN C Y, WU H Y, et al. Antimicrobial peptide Epinecidin-1 promotes complete skin regeneration of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-infected burn wounds in a swine model [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(13): 21067-80.
- [27] 苏涌, 许杜娟, 高昌琨, 等. 八号膏对大鼠深II度烫伤模型创面的治疗作用及其机制研究[J]. 中成药(SU Y, XU D J, GAO C K, et al. Study on the therapeutic effect and mechanism of No. 8 ointment on the wound of rat deep second degree scald model [J]. *Chinese Patent Medicine*, 2013, 35(1): 20-3.
- [28] 赵春霖, 金莉莉, 邵思佳, 等. 重组融合多肽hEGF-AWRK6的纯化及对小鼠烫伤感染创面愈合的影响[J]. 生物工程学报(ZHAO C L, JIN L L, TAI S J, et al. Purification of recombinant fusion polypeptide hegf-awrk6 and its effect on wound healing of scald infection in mice [J]. *Journal of Bioengineering*, 2018, 34(10): 1642-9.
- [29] 许冈跃, 陈骅. 芹菜素对深II度烧伤创面愈合的影响及机制研究[J]. 中国中医药科技(XU G Y, CHEN H. Effect of apigenin on deep second degree burn wound healing and its mechanism [J]. *Chinese Medicine Science and Technology*, 2021, 28(5): 716-9.
- [30] SANCHEZ M, HERRUZO R, MARBAN A, et al. Risk factors for outbreaks of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in critical burn patients [J]. *J Burn Care Res*, 2012, 33(3): 386-92.
- [31] CONLON J M, KOLODZIEJEK J, NOWOTNY N. Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1696(1): 1-14.
- [32] SCHRODER J M, HARDER J. Antimicrobial peptides in skin disease [J]. *Drug Discovery Today Therapeut Strateg*, 2007, 3(1): 93-100.
- [33] MORADALI M F, GHODS S, REHM BERND H A. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 39.
- [34] LU X, KANG Y. Epidermal growth factor signalling and bone metastasis [J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(3): 457-61.
- [35] KUBO H, HAYASHI T, AGO K, et al. Temporal expression of wound healing-related genes in skin burn injury [J]. *Leg Med*, 2014, 16(1): 8-13.
- [36] 范好, 宋强. HIF-1 α 和VEGF蛋白的表达与胃癌浸润转移的相关性研究[J]. 甘肃医药(FAN Y, SONG Q. HIF-1 α correlation between the expression of and VEGF protein and invasion and metastasis of gastric cancer [J]. *Gansu Medicine*, 2012, 31(12): 887-90.
- [37] 张玉萱, 徐玲玲, 李斌, 等. 生肌化瘀膏对小鼠创面修复期肉芽组织总IL-1 β 和I、III型胶原的影响[J]. 中国药师(ZHANG Y X, XU L L, LI B, et al. Effect of shengji huayu ointment on total IL-1 β in granulation tissue of mice during wound repair and type I and III collagen [J]. *China Pharm*, 2018, 21(2): 246-50.