

昆虫防御素基因(defensin)的起源与分子进化

李培¹ 王波¹ 朱杰² 黄原¹

(1 陕西师范大学生命科学学院 西安 710062 2 西北农林科技大学生命科学学院 杨凌 712100)

摘要:果蝇防御素基因位于它的第二条染色体右臂上,其编码产物具有抗菌肽活性,主要对革兰氏阳性菌有抗性。由于其有牢固的分子骨架、广泛的分布以及生物活性,对它的研究已成为当前国际研究热点。本文主要使用 NCBI 的资源分析黑腹果蝇防御素及其同源序列,并讨论了昆虫防御素的起源和分子进化。

关键词:昆虫防御素;同源蛋白质;基因树;物种树

Molecular Evolution and Origin of Insect Defensin Gene

LI Pei¹, WANG Bo¹, ZHU Jie-xi², HUANG Yuan¹

1 College of Life Science, Shanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

2 College of Life Science, Northwest Sci & Tech University of Agricultural & Forestry, Yangling 712100, China

ABSTRACT: Defensin, abbreviated as def., is a kind of special nuclear gene of insects. Defensin, existing in the right arm of the second chromosome of *Drosophila melanogaster*, encodes a product which possesses an anti-bacterial peptide activity and resists Gram-positive bacteria. Because of firm molecular skeleton, extensive distribution and biological activity, at present, defensin is being studied widely. In this paper, 20 species of insects have been analyzed based on def. using ClustalX 1.8 and Mega2.1 software.

Key words: Defensin; Hemology protein; Gene tree; Evolution tree

1 昆虫防御素基因

1.1 基因简介

防御素基因定位于果蝇的第二条染色体右臂上,并且它在基因组序列上长 275390bp。按基因功能分类为昆虫防御素,这个基因转录为 CG1385-RA。此基因能够全表达,它缺乏 3'端和 5'端不翻译区以及内含子。其基因产物昆虫防御素由 92 个氨基酸残基组成。

1.2 基因结构特点

防御素(defensin)是一种典型的真核基因,具有一个 CAAT 框,一个 TATA 框,一个昆虫特异的帽子位点和多聚腺苷酸加尾信号序列 AATAAA,以及内元和假基因^[1]。各种抗菌多肽与蛋白以前体形式转录,在成熟蛋白前有一段信号肽和一段 2~35 个氨基酸残基的蛋白质序列。迄今为止,人们已成功的构建了昆虫防御素的 cDNA,典型的模式都是信号肽,双肽前区,成熟抗菌肽, α -酰胺前体^[2]。用克隆的 cDNA 研究了昆虫的双翅肽和昆虫防御素基因的表达,两种基因是在同类细胞-类血小板和脂肪细胞中相伴表达,不因诱导刺激的不同而受影响。这些免疫基因的转录寿命较短,第二次诱导反应与第一次相似,说明昆虫对第一次诱导不保持“记忆”^[3]。

1.3 昆虫防御素结构

昆虫虽然没有完善的免疫防御体系,但却具有高效的无细胞免疫系统。抗菌肽是昆虫免疫后血淋巴中一类抗菌多

肽,它具有分子量小、热稳定、水溶性好、无免疫原性、抗菌谱广等特点。现在,它被认为是从细菌到高等哺乳动物普遍存在的一类防御性多肽,称之为“第二防御体系”。它不仅抗菌谱广,可抑杀某些真菌、病毒及原虫,并对多种癌细胞及动物实体瘤有明显的杀伤作用,且不破坏正常细胞^[2]。

昆虫防御素最早由 Matuyama 和 Natori 及 Lambert 等分别从麻蝇和丽蝇 *Phomia terranorae* 中分离获得。昆虫防御素在功能与结构上均与已知的昆虫抗菌蛋白无关,但与哺乳动物中由粒细胞产生的碱性杀菌肽防御素很相似,因此而得名^[4]。它广泛存在于昆虫纲中,现在双翅目、鞘翅目、膜翅目、毛翅目、半翅目和蜻蜓目中均有报道,也存在于其它节肢动物如蝎子 *Buthus equeus* 中。但目前在鳞翅目中尚未有报道。现有 20 种昆虫防御素的氨基酸序列已明确^[5]。昆虫防御素是昆虫免疫的几个主要的膜活性多肽类群之一^[6]。昆虫防御素是阳离子肽,除蜂王浆^[7]和血淋巴^[8]中的蜂王肽(royalism)含 51 个氨基酸残基外,一般由 34~43 个氨基酸残基组成,它含有 6 个半胱氨酸,以构成 3 个分子内二硫键^[9]。丽蝇的防御素的三级结构也已得到详细研究,其分子量为 4kDa,主链含 N-端环(4~14 位氨基酸残基)和一个 α -螺旋(15~23 位氨基酸残基)接着是一个扭曲的双链的反平行 β -折叠(β 1: 27~31 位氨基酸残基;35~39 位氨基酸残基, β 折叠双链由 3 个氨基酸残基回折相连)。丽蝇防御素 A 因其 α -螺旋和 β -折叠由两个二硫键相连,而形成了一个半胱氨酸稳定的 α , β -基序(Cs α β motif)。这种 Cs α β 基序存在于大多数防御素中。昆虫防御素结构与蝎子防御素和植物抗病硫堇(γ -thionin)相似,而与哺乳动物防御素则有明显区别,即哺乳动物仅由 β -折叠而无 α -螺旋^[9]。

1.4 昆虫防御素的主要功能

昆虫防御素主要抗革兰氏阳性(G+)细菌,偶尔也有抗革

作者简介:李培(1981-),女,陕西西安市人,陕西师范大学硕士研究生,主要从事昆虫分子生物学研究。

E-mail: lp1063@stu.snnu.edu.cn

(收稿日期:2006-03-18 接受日期:2006-04-13)

兰氏阴性(G⁻)细菌或真菌的报道。但革兰氏阴性细菌一般对其有抗性,而且可以通过其外膜抵抗这些物质^[6]。丽蝇防御素能打破藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* 质膜渗透性屏障,引起胞质内 K^+ 和 ATP 下降,以及质膜部分剥离和细胞呼吸受阻,这些现象与防御素引起质膜脂质体内形成通道有关^[10]。此外考虑到昆虫防御素结构与蝎毒素(charyb dotoxin)相近,而认为它不仅具有抗菌作用,而且还有 K^+ 通道封阻剂之作用,如麻蝇肽 B 能部分阻止鼠小脑浦肯野氏细胞(Cerebellon Purkinje cell) K^+ 诱导产生的电压脉冲电流。与能在一分钟内将细菌溶解的天蚕素相比,昆虫防御素杀死细菌的速度相对较慢,这两者的作用机制似乎很不同^[6]。昆虫防御素的表达只能在微生物入侵或引起发炎、感染的诱导剂存在下,才能诱导表达。昆虫防御素的构效关系还不清楚,一般认为六个半胱氨酸残基组成的三个分子内二硫键和富含精氨酸是其生物活性所必需的^[11]。

1.5 昆虫防御素的其它功能

Ganz 报道,与防御素共同培养的肥大细胞,与脱颗粒现象,表明防御素在体内可能参与过敏反应^[10]。HNP1(加入少量 HNP2)对单核白细胞有很强的趋化作用。防御素还起调理的作用,发现防御素附着在细菌表面后,除了本身对细菌的损伤以外,还可以使细菌被吞噬消化^[13]。防御素在内分泌系统中,可以抑制甾醇类激素的分泌^[14]。在体外,防御素还具有抑制蛋白激酶 C 的作用。此外, Higazi 等研究发现^[15],防御素可增强 LP(a) 脂蛋白与内皮细胞的结合能力达五倍,与内层平滑肌细胞的结合能力达六倍。

1.6 昆虫防御素的作用机制

大量的研究资料已表明,防御素与其它类型抗菌肽作用机制相似,它们主要是通过细胞膜上形成通道,引起细胞离子通透性的失衡和胞内物质的泄漏,进而导致细胞活动的异常。防御素在细胞膜上的通道形成过程与膜的磷脂组成成分和所处的温度环境等因素有关。然而,一旦防御素在膜上形成了通道,上述因素便不会对其通道的活动构成本质影响。防御素形成膜通道的方式有多种推测,先形成寡聚体随即插入膜,或单位先插入膜,随后在膜上通过单位的侧向运动聚集成寡聚体。另 Hill 针对 HNP-3 的研究结果提出,防御素以 4~8 个二聚体在膜内侧排列成圆筒状,二聚体疏水侧朝外镶嵌在膜的脂质体中,亲水侧朝向圆筒内形成具有通透性的孔洞^[16, 17]。

1.7 果蝇防御素基因简介(见表 1)

2 数据来源和分析方法

2.1 数据来源

发现一种昆虫特有的基因 defensin(def)。在 NCBI 数据库里搜索到 def 的 DNA 序列和翻译的蛋白质序列,将其下载。用 def 的蛋白质序列在 NCBI 的 BLAST 搜索到蛋白质的同源序列,选择几种具有代表性的蛋白质序列以及它们的种属名下载。(见表 2)

2.2 分析方法

将选择好的同源蛋白质序列用 ClustalX 软件进行比对,其

间转换参数,寻找并选定一个最好的比对结果。用 Mega2 软件将 .aln 文件转换为 .meg 文件,计算出基因之间的遗传距离,并用 4 种不同的方法(UPGMA、NJ、ME、MP)建树,进而得出不同基因之间的进化关系。

3 结果

3.1 蛋白质序列比较(不同的氨基酸数目)(见表 3)

3.2 分子进化树

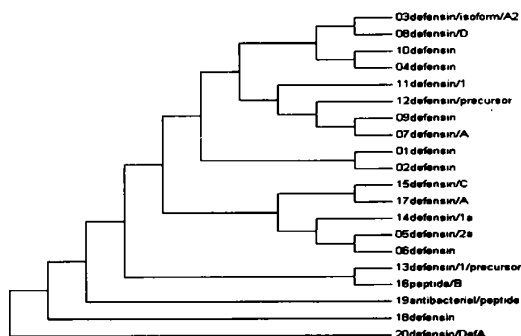


图 1 以 Mp 法构建的果蝇分子进化树

Figure 1 Molecular Cladogram of Drosophila Constructed by Mp Method.

1- 12, 14, 20 均为双翅目。01, 02 为果蝇属的黑腹果蝇和 simulans 果蝇; 03 为蚊科伊蚊属的埃及伊蚊; 08 和 10 为伊蚊属的白纹伊蚊; 04 为按蚊属的冈比亚按蚊; 12 为库蚊属的尖音库蚊; 05, 06, 11, 14 均为蝇科螫蝇属厩螫蝇; 07 为蝇科原状蝇属的新陆原状蝇; 09 为家蝇属的舍蝇; 20 为舌蝇属的刺舌蝇; 15, 17 为半翅目红猎蝽属的长红猎蝽; 13 为鞘翅目锦天牛属的灰黄锦天牛; 18 为膜翅目蜜蜂科的意大利蜜蜂。

4 讨论

昆虫的昆虫防御素基因都源于同一祖先,从分子进化树可看到在螫蝇属的厩螫蝇中 def2a, def1a, def 三个蛋白出现不同是由于基因重复或扩增引起同一物种内的并系同源。而半翅目红猎蝽属的长红猎蝽中的 defA 和 defB 也是由于基因重复或扩增引起的并系同源。其余的都是由于物种形成事件引起的直系同源,只是时间顺序不同。例如双翅目蝇科、舌蝇属的刺舌蝇首先与其他的同源蛋白质分离,说明了刺舌蝇的昆虫防御素在较早时期就与其它防御素的分化;膜翅目的意大利蜜蜂、鞘翅目的独角仙也先后分化出去。由分子进化树可看出它与物种树有一定差别。例如双翅目的刺舌蝇并未与它同目的其它昆虫一起进化而是首先分化出去。这是由于分子进化树是用基因组中一个小区域组建并非全基因组,因而与物种树有差别。昆虫防御素基因存在于双翅目、鞘翅目、半翅目中。不同科、属、种甚至同种昆虫中的昆虫防御素都有不同程度的差异,它们之间存在着直系同源或并系同源的关系。随着基因分化时间的长短,同源蛋白质序列的氨基酸差异或大或小,但他们的功能大体相同,均为昆虫防御素,所以昆虫防御素的表达产物有一定的保守性。

表 1 果蝇防御素基因简介
Table 1 A Brief Introduction of Defensin

基因名称	昆虫防御素(defensin)
基因符号	Def
基因同义字	CG1385; defensin; Def
细胞学图谱位置	46D9
分子功能	抗菌肽; 抗革兰氏阳性菌肽
基因分析	基因全表达
表达位置	胚胎/ 幼体/ 成体的脂肪体中
基因序列	ATGAAGTTCCTCGTTCTCGTGGCTATCGCTTTTGCTCTGCTTGCTTGGCTGGCGCAGG
	CTCAGCCAGTTTCGATGTGGATCCAATTCCAGAGGATCATGTCCTGGTGCATGAGGATG
	CCCACCAGGAGGTGCTGCAGCATAGCCGCCAGAAGCGAGCCA CATGGACCTACTCTCC
	AAGTGAAC TCGAACCACACCGCCTGCGCCGGCCACTGCATTGCCAAGGGGTTCAAAGG
	CGGCTACTGCAACGACAAGGCCGTCTGCGTTTGCGCAATTGA
蛋白质序列	MKFFVLVAIAFALLACVAQAQPVSDVDPIEDHVLVHEDAHQEVLQHSRQKRATCDLLSKW
	NWNHTACAGHCIAKGFGKGGYCNDKAVCVCRN

表 2 同源蛋白质序列
Table 2 Homologous Protein Sequence

No	Gi 号	物种名	蛋白名	同源蛋白质序列
01	29367256	Drosophila	defensin	MKFFVLVAIAFALLTCMAQAQPVSDVDPIEDHVLVHEDAHQEVLQHSR
		melanogaster		QKRATCDLLSKWNNHTA CAGHCIAKGFGKGGYCNDKAVCVCRN
02	29367200	Drosophila	defensin	MKFFVLVAIAFALLACMAQAQPVSDVDPIEDHALVHEDAHQEVVQHSR
		simulans		QKRATCDLLSKWNNHTA CAGHCIAKGFGKGGYCNDKAVCVCRN
03	5107401	Aedes	Defensin	MQSITVICFLALCTGATSAYPQEPVLADEARPFANSLFDELPEETYQAAV
		aegypti	isoform A2	ENFRLKRATCDLLSGFGVGDSACAAHCIARGNRGGYCNSKKVCVCRN
04	1174329	Anopheles	defensin	NSRVNGATPAKLKLVLLCLPRASSPQLIMKCATIVCTIAVLAATLLNGSV
		gambiae		QAAPQEEAALSGGANLNTLLDELPEETHHAALENYRAKRATCDLASEGCV
05	5924287	Stomoxys	defensin	GSLCAAHCIARRYRGGYCNSKAVCVCRN
		calcitrans	2a	MKFFSLFPVILVVVACITMRANAAPSAGDEVDDHPDYVDGV EALRQLEPEL
06	3913442	Stomoxys	defensin	HGRYKRATCDLLSMWNVNHSACAAHCLLLGKSGGRNDDAVCVCRK
		calcitrans		MKFFSLFPVIVVVACITMRANAAPSAGNEVDHHPDYVDGVEALRQLEPEL
07	118432	Protophormia	defensin A	HGRYKRATCDLLSMWNVNHSACAAHCLLLGKSGGRNDDAVCVCRK
		terraenovae		MKFFMVVVVTFCLAVCFVSQSLAIPADAANDAHFVDGVQALKEIPELHGRY
08	3641324	Aedes	defensin	KRATCDLLSGTGINHSACAAHCLLRNRGGYCNGKGVCVCRN
		albopictus	D	VPTVICFLAMCLVAITGAYPQEPVLADEAQSVANSLFDELPEESYQAAVENLRL
09	30691693	Musca	defensin	KRATCDLLSGFGVGDSACAAHCIARGNRGGYCNSKKVCVCI
		domestica		MKYFTMFAFFVAVCYISQSSASPKEEAFVHGADALKQLEPELHGRYKRA
10	9800542	Aedes	defensin	TCDLLSGTGVGHSACAAHCLLRNRGGYCNGKGVCVCRN
		albopictus		DELPEETYQAAVENYRRKRATCDLLSGFGVGDSACAAHCIARRNRGGYCN
11	5924289	Stomoxys	defensin 1	TVVCV
		calcitrans		ATCDLLSGMGVNHSAACAHCVLRGNRGGYCNSKAVCVCR
12	28394748	Culex pipiens	defensin	ATCDLLSGFGVNDACAAHCILRNRGGYCNCCKKVCVCRN
		pipiens	precursor	
13	13625795	Acalolepta	Defensin	MKFFITFTFVLSLVITVYSAPREFAEPEEQDEGHFRVKRFTCDVLSV
		luxuriosa	lprecursor	EAKGVKLNHAACGIHCLFRRRTGGYCNCCKRVCI
14	5924283	Stomoxys	defensin	MKFLNVVAIALLVVACLVSNAAPHEGVEVAAAKPMGITCDLLSLWKVG
		calcitrans	1a	HAACAAHCLVLGNVGGYCTKEGLCVCKE
15	29335962	Rhodnius	defensin C	MKCILSLFTLFLVATLVSYPAEWNSQHQLDDAQWEPAGELTEEHLSR
		prolixus		MKRATCDLLSITSKWFTPNHAGCAACIFLGNRGGRCVGVCHCRK
16	118427	Zophobas	peptide B	
		atratus		FTCDVLGFEIAGTKLNSAACGAHCLALGRRGGYCNSKSVCVCR
17	29335958	Rhodnius	defensin A	MKCILSLVTLFLVAVLVHSHPAEWNTHQQLDDALWEPAGEVTEEHVARLKR
		prolixus		ATCDLFSFRSKWVTPNHAAACAHCLLRNRGGRCCKGTICHCRK
18	13184963	Apis	defensin	FEPLEHFENERADRHRRVTCDLLSFKGVQVNDACAANCHSLGK
		mellifera		AGGHCCKGVCI
19	1481023	Allomyrina	defensin	
		dichotoma		VTCDLLSFEAKGFAANHSLCAAHCLAIGRRGGSCERGVCICRE
20	17027171	Glossina	defensin A	MKFYLVLAFLTLCVAVTALPAGDETRIDLETLEDLRLVDGAQVTGELKRDK
		morsitans		RVTGNIGEWVCVAHCNSKSKSGYCSRGVCYCTN

表 3 蛋白质序列比较
Table 3 Comparison of Protein Sequence

序号	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
01																				
02	3																			
03	48	48																		
04	17	17	14																	
05	60	58	48	22																
06	62	62	49	22	22															
07	18	18	18	18	19	20														
08	34	34	32	20	32	33	14													
09	51	51	56	17	56	56	16	30												
10	52	52	56	17	57	57	16	30	2											
11	49	49	47	19	47	46	18	22	38	39										
12	54	53	51	15	59	58	17	27	61	61	53									
13	55	54	52	16	59	58	18	28	62	62	53	13								
14	28	27	23	17	31	32	17	18	30	30	25	5	6							
15	60	60	56	17	65	66	18	33	68	68	57	41	42	10						
16	13	13	18	16	14	14	17	14	13	13	18	3	5		5	9				
17	50	49	52	16	51	50	15	27	52	52	47	46	47	15	51	5				
18	12	12	17	15	14	13	15	15	10	10	16	6	7	8	9	5	5			
19	50	49	49	15	50	50	14	28	55	55	49	48	50	17	55	5	27	5		
20	62	62	55	20	65	67	19	33	68	68	56	63	64	32	66	20	59	20	61	

参 考 文 献

[1] D A Lidholm, GH Gudmundsson, and HG Boman A highly repetitive, mariner- like element in the genome of Hyalophora cecropia[J]. J. Biol. Chem. , 1991, 266: 11518- 11521

[2] 赵东红, 戴祝英, 周开亚. 昆虫抗菌肽的功能、作用机理与分子生物学研究最新进展[J]. 生物工程进展, 1999, 19(5): 57- 62

[3] Dimarcq J L. Insect immunity. Purification and characterization of a family of novel inducible antibacterial protein from immunized larvae of the diptean Phormia teranocae and complete amino acid sequence of the predominant member, dipterecin A[J]. Eur. J. Biochem. 1988, 171: 17~ 22

[4] Lambert J. Insect immunity: Isolation from immune blood of dipterian Phormia teranocae of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bacterial peptides [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989, 86: 262~ 266

[5] Brey P T, Hultmark D. . Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insect [M]. London: Chapman&Hall. 1998

[6] 张青文. 昆虫遗传学[M]. 北京: 科学出版社, 2000

[7] Fujiwara Y, Juida M, Newitt R et al. Cloning of an ecdysone receptor homology from Manduca sexta and the developmental profile of its mRNA in wing[J]. Insect Biochem. Mol. Biol. , 1995, 25: 845~ 856

[8] Castells P, Ampe C, Jacobs F et al. Functional and chemical characterization of hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (Apis mellifera) [J]. J. Biol. Chem. 1993, 268: 7044~ 7045

[9] 程家安, 唐振华. 昆虫分子科学[M]. 北京: 科学出版社, 2001

[10] Cocianich S, Dupont A, Hegy G et al. 1994. Novel inducible antibacterial peptides from a hemipteran insect[J], Pyrrhocoris. Biochem. J. , 300: 567~ 575

[11] 李洪军, 胡宗利, 魏泓. 防御素(Defensin) 研究进展[J]. 生物工程进展, 2001, 21(3): 33~ 36

[12] Ganz J, Selsted M E, Lehrer D I. Polymorphic expression of defensins in neutrophils from outbred rats[J]. Eur J Haematol, 1990, 44(1): 1~ 8

[13] Ganz J, Rayne J R, Valore E V et al. Infectious Complications of Swan - Ganz Pulmonary Artery Catheters[J], J Immunol, 1989, 143: 1385 ~ 65

[14] Zhu Q Z, Hu J, Mulay S et al. Production of β - defensins by human airway epithelial[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85: 14961- 14966

[15] Higazi A A, Iavai E, Bleier K et al. Defensin stimulates the binding of Lp(a) to human vascular endothelial and smooth muscle cells[J]. Blood, 1997, 89(12): 4290~ 4298

[16] 童青春, 吉永华. 一类新型的活性肽- 生物防御素[J]. 生命科学, 1999, 13(2): 23~ 29

[17] 蒋红波, 王进军. 昆虫免疫防御系统的限制因素. 现代生物医学进展, 2006, 6(2): 86~ 90