

细菌细胞壁肽聚糖的研究

刘芳, 杨跃寰

(四川理工学院生物工程学院, 四川 自贡 643000)

摘要: 肽聚糖是真细菌细胞壁中特有的成分, 因其在细菌细胞壁的生理功能中发挥着主要作用, 而成为目前细菌细胞壁方面研究的主题。介绍了细菌细胞壁肽聚糖的化学组成、结构特点、分类、分离纯化、生物合成、生物学功能及应用前景等。

关键词: 肽聚糖; 分离纯化; 生物合成; 生物学功能

中图分类号: Q936

文献标识码: B

引言

细菌细胞壁与细胞膜、细胞质、核区等同属细菌细胞的一般构造, 它是位于细胞最外的一层厚实、坚韧的外被, 具有固定细胞外形和保护细胞不受损伤等多种生理功能。细菌细胞壁由一些化学成分不同的物质组成, 如肽聚糖、磷壁酸、脂多糖、磷脂、外膜蛋白等, 在这些组成成分中对细胞壁的生理功能起主要作用的是肽聚糖, 除少数细菌如产甲烷细菌这类古细菌的细胞壁是由其他化学物质组成外, 几乎所有细菌的细胞壁都含有肽聚糖, 在 G^+ 细菌中肽聚糖含量高达30%~95%, G^- 细菌也有5%~20%的含量。目前, 虽然国内外对肽聚糖的组成与结构有许多陈述, 对其分离纯化、生物学活性等方面也有较多的研究, 但有关肽聚糖综述的文章甚少, 本文旨从细菌细胞壁肽聚糖的化学组成、结构特点、分类、分离纯化、生物合成、生物学功能以及应用前景等方面做一较为全面的介绍。

1 肽聚糖的化学组成与结构特点

肽聚糖属于聚合物, 由肽和聚糖两部分组成, 其中的肽包括四肽尾和肽桥两种, 而聚糖则是由N-乙酰葡萄糖胺(NAG)和N-乙酰胞壁酸(NAM)两种单糖相互间隔连接成的长链, 这种肽聚糖分子呈网格状, 它们相互交织成一个致密的网套覆盖在整个细胞上^[1]。

看似十分复杂的肽聚糖分子, 其基本组成单位为简

单的肽聚糖单体, 每一肽聚糖单体由3部分组成: ①双糖单位: 由一个N-乙酰葡萄糖胺通过 $\beta-1,4$ 糖苷键与另一个N-乙酰胞壁酸相连。②四肽尾: 由4个氨基酸分子缩合而成, 并以酰胺键与N-乙酰胞壁酸中的乳酰基团相连。不同的 G^+ 细菌, 它的四肽尾氨基酸的组成与顺序有所不同, 主要体现在第3位氨基酸上, 如金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的四肽尾为L-Ala \rightarrow D-Glu \rightarrow L-Lys \rightarrow D-Ala, 星星木棒杆菌(*Corynebacterium poinsettiae*)的四肽尾为L-Ser \rightarrow D-Glu \rightarrow L-Orn \rightarrow D-Ala。而 G^- 细菌的四肽尾变化不大, 四肽尾中只含有以1:1:1.5~2.0比例的D-Glu、m-DAP和D,L-Ala, 以大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)为例, 四肽尾为L-Ala \rightarrow D-Glu \rightarrow m-DAP \rightarrow D-Ala。③肽桥: 是连接前后2个四肽尾分子的“桥梁”, 肽桥的变化甚多, 目前已超过100种。就 G^+ 细菌, 其肽桥多为短肽链, 如在*S. aureus*中, 肽桥为甘氨酸五肽(—Cly₅—)。而 G^- 细菌无特殊肽桥, 前后两单体间的连接仅通过甲四肽尾的第四个氨基酸的羧基与乙四肽尾的第三个氨基酸的氨基缩合形成肽键(—CO·NH—)直接相连, 因而与 G^+ 细菌相比肽聚糖网套稀疏, 机械强度差。

2 肽聚糖的多样性与分类

从肽聚糖的结构特点可以看出, 不同的细菌其肽聚糖链骨架结构基本相同, 但相邻两条四肽尾间的交联方式、四肽尾氨基酸的组成与顺序以及肽桥的种类却有所不同。

收稿日期: 2011-09-09

作者简介: 刘芳(1966-), 女, 四川自贡人, 副教授, 主要从事微生物学方面的研究 (E-mail) sy5162524@sina.com

区别,由此形成了肽聚糖的多样性。

通过对不同的 G^- 细菌肽聚糖的结构进行分析, G^- 细菌肽聚糖邻近四肽尾间都是直接交联,它们的四肽尾变化也不大,故所有的 G^- 细菌的肽聚糖都属于同一类型。而 G^+ 细菌的肽聚糖由于邻近四肽尾的交联方式不同,四肽尾氨基酸的组成与顺序变化较大,肽桥类型甚多,故呈现出结构的多样性。按照 Schleifer 与 Kandler 1972 年提出的肽聚糖的分类系统,将 G^+ 细菌的肽聚糖分为以下类型:①根据连接在 N-乙酰胞壁酸上的相邻的两条四肽尾之间交联方式的不同,将肽聚糖分为 A、B 两群,一条四肽尾的第 3 位氨基酸与另一条四肽尾的第 4 位氨基酸之间交联的肽聚糖为 A 群,一条四肽尾的第 2 位氨基酸与另一条四肽尾的第 4 位氨基酸之间交联的为 B 群。B 群肽聚糖比 A 群少见,只在某些棒状细菌特别是植物病原性棒状杆菌中发现。②根据肽桥种类的不同,又将 A 群分为 A1、A2、A3、A4 四个亚群,B 群分为 B1、B2 两个亚群。③根据四肽尾第 3 位氨基酸的不同,将每一亚群(A2 亚群除外)又分成 α 、 β 、 γ 三种变异型,如 A1 α 、A1 β 、A1 γ 、B1 α 、B1 β 、B1 γ 等^[2]。

3 肽聚糖的分离纯化与化学成分的分析

目前国内外研究者已对多种细菌细胞壁肽聚糖进行了分离纯化和化学成分的分析,研究最多的是乳酸菌,不同细菌细胞壁肽聚糖的提取方法有所不同。孟凡伦等^[3]参照 Park 等人的方法对乳链球菌 SB900 细胞壁肽聚糖进行了分离纯化和化学成分的分析,结果表明,乳链球菌 SB900 胞壁肽聚糖中蛋白质含量为 9.84%,NAG 为 0.871 $\mu\text{mol}/\text{mg}$,NAM 为 1.14 $\mu\text{mol}/\text{mg}$,氨基酸分析结果表明含量较高的氨基酸为 Ala、Glu、Asp,分别为 1.046、0.775、0.304 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 。马西芝等^[4]用质量浓度为 8g/dL 的 SDS 处理乳酸杆菌粗细胞壁,处理时间为沸水浴 10min,SDS 结合胰蛋白酶和 TCA 处理,可有效去除乳酸杆菌中的非共价结合蛋白质及共价结合蛋白质。经化学分析鉴定,所提取的乳酸杆菌成分为肽聚糖,肽聚糖中 Ala、Asp、Glu 和 Lys 浓度分别为 1.181、0.943、0.770 和 0.456 mmol/g,是肽聚糖中的组分氨基酸。刘景圣等^[5]分别采用超声波法、溶菌酶法、三氯乙酸法对嗜酸乳杆菌细胞壁肽聚糖进行分离提取,通过多重比较,最终确定采用三氯乙酸法提取嗜酸乳杆菌细胞壁肽聚糖,其肽聚糖得率为 15.8%。

4 肽聚糖的生物合成与抗生素对肽聚糖合成的抑制作用

以 G^+ 细菌 *S. aureus* 为例,整个肽聚糖的生物合成

过程约有 20 步,根据反应部位的不同,可分成在细胞质中、细胞膜上和细胞膜外 3 个合成阶段。①第一阶段:在细胞质中合成,由葡萄糖合成 N-乙酰葡萄糖胺(UDP-NAG)和 N-乙酰胞壁酸(UDP-NAM),再由 N-乙酰胞壁酸合成“Park”核苷酸,即 UDP-NAM-五肽。此阶段自 N-乙酰葡萄糖胺-1-磷酸开始,以后的 N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰胞壁酸和“Park”核苷酸都要与糖载体 UDP 相结合。②第二阶段:在细胞膜上进行,由“Park”核苷酸与 N-乙酰葡萄糖胺、甘氨酸五肽合成肽聚糖单体。这一阶段中有一种称为细菌萜醇的类脂载体参与。③第三阶段:在细胞膜外进行,由肽聚糖单体插在细胞壁生长点中并交联形成肽聚糖。这一阶段首先是通过转糖基作用,使多糖链在横向上延伸一个双糖单位,再通过转肽酶的转肽作用,最终使前后 2 条多糖链间形成甘氨酸五肽桥而发生纵向交联^[1]。

肽聚糖在合成的不同阶段会受到某些抗生素的抑制作用,如青霉素能抑制第三阶段的转肽作用,其作用机制是:青霉素是肽聚糖单体五肽尾末端的 D-丙氨酰-D-丙氨酸的结构类似物,两者互相竞争转肽酶的活性中心,当转肽酶一旦与青霉素结合,前后 2 个肽聚糖单体间不能形成肽桥,因此合成的肽聚糖缺乏机械强度,由此产生了原生质体或球状体这类在不利环境下极易裂解死亡的细胞壁缺损细菌。另外,环丝氨酸(唑啉霉素)能抑制第一阶段的 D-丙氨酰-D-丙氨酸的合成,万古霉素和杆菌肽能抑制第二阶段“Park”核苷酸合成肽聚糖单体。由于以上抗生素均对肽聚糖的合成有抑制作用,故常被用作抑菌药物。

5 肽聚糖的生物学活性与有益的生物学功能

肽聚糖具有多种重要的生物学活性,如免疫调节、抗感染、抗肿瘤、抗新陈代谢活性、致热性、细胞毒性、粘附作用等^[6],其有益的生物学功能越来越引起国内外学者的重视,目前对其免疫活性和抗癌活性研究较多,其免疫调节功能和抗癌作用也逐渐被人们所利用。

肽聚糖具有免疫学活性,它是一种免疫增强剂,它能够通过诱导各种非特异免疫因子或特异性免疫因子的释放或表达来发挥其免疫功能。Sekine^[7]曾报道,双歧杆菌完整肽聚糖能激活小鼠腹腔巨噬细胞,使其白细胞介素 1(IL-1)、白细胞介素 6(IL-6)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等细胞因子的 mRNA 表达增强。国内蓝景刚等^[8]通过实验证明,双歧杆菌细胞壁肽聚糖确能增强小鼠腹腔局部巨噬细胞来源的细胞因子如 IL-1、IL-6 和 TNF- α 的活性。赵予秀等^[9]研究发现植物乳杆菌肽聚糖能提高小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬率和吞噬指数,

具有提高细胞免疫作用。双杰等^[10]证实乳酸杆菌肽聚糖对鸡接种新城疫油乳剂灭活疫苗和禽流感亚型油乳剂灭活疫苗具有免疫增强作用。孟凡伦等^[11]研究认为,通过肌肉注射乳链球菌 SB900 胞壁肽聚糖可激活中国对虾体内的细胞防御体系。张璐一等^[12]以鲈鱼为研究对象,研究饲料中添加肽聚糖对其生长和非特异性免疫力的影响,研究结果表明,随着饲料中肽聚糖添加量的升高,鲈鱼的生长和非特异性免疫力均显著上升。许国焕等^[13]在彭泽鲫的基础饲料中添加 200mg/kg 自提肽聚糖 60d 后,血清溶菌酶活性显著提高,并能在短时间内提高血清凝集抗体效价,增强了彭泽鲫的免疫功能。

肽聚糖具有抗癌活性,在体内外具有显著的抗癌作用。Ishihara 等^[14]将青春型双歧杆菌的全肽聚糖注射于恶性黑色素瘤患者的皮肤转移灶内,发现它能使转移灶体积明显缩小。Sekine 等^[15]证实婴儿型双歧杆菌全肽聚糖能显著抑制小鼠皮下移植的 Meth A 纤维肉瘤的生长。SunJ 等^[16]研究发现,乳酸杆菌肽聚糖能够通过激活巨噬细胞,引起机体免疫应答来发挥抗肿瘤作用。蔡良真等^[17]采用体外和动物体内实验,证明双歧杆菌完整肽聚糖在体外对人结肠癌细胞株具有显著的选择性杀伤作用,体内给药可明显降低大鼠大肠肿瘤发生率。温晓庆等^[18]从干酪乳杆菌 *Lb. casei. Zhang* 细胞壁中分离得到肽聚糖,体外培养条件下,利用流式细胞仪检测肽聚糖对人胃癌 BGC-823 细胞生长周期的影响,在体内实验中,采用原位杂交、免疫组化等方法,研究肽聚糖对小鼠肝癌 H₂₂ 细胞移植瘤的抵抗作用,结果显示,干酪乳杆菌 *Lb. casei. Zhang* 细胞壁肽聚糖能够通过阻止癌细胞增殖,并调控相关增殖基因和细胞凋亡基因的表达,发挥其抗肿瘤作用。杨平等^[19]从两歧双歧杆菌中提取完整肽聚糖,以人胃癌裸鼠移植瘤为动物模型,研究了完整肽聚糖对人胃癌裸鼠移植瘤的抑制作用,实验表明,完整肽聚糖能抑制裸鼠体内胃癌的生长。

6 肽聚糖的应用前景与展望

肽聚糖是真细菌细胞壁所特有的一种结构大分子物质,由于其结构的多样性,常被用作现代微生物分类鉴定中的重要依据;由于其在生物合成的过程中可被环丝氨酸、万古霉素、杆菌肽与青霉素等许多抗生素抑制,因而是一种重要而且在抗生素治疗上有着特别意义的物质;由于肽聚糖具有免疫调节活性,且低分子量的肽聚糖对机体全无毒性,人们已从细菌细胞壁中人工提取或人工合成大量的肽聚糖物质,经口服或非胃肠道途径将其作为畜禽饲料添加剂或药物添加剂应用于畜牧业生产中,以增强畜禽及水产动物的抗病能力;由于肽聚

糖具有抗癌活性,已开发成具有重要价值的、新型高效的、低毒的抗肿瘤药物。但肽聚糖要成为理想的添加剂和人类医药产品,有些问题还有待于更深入地探索研究,如剂量的多少、体内活性的长短以及与其他药物有无拮抗作用等。当然,肽聚糖的应用价值仅非本文所述,相信,随着人们对肽聚糖生物学活性的进一步认识,肽聚糖的应用前景将更加广阔,其多种有益的生物学功能将会被人们更加广泛地用于科研和实践。

参考文献:

- [1] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [2] 和致中. 细菌细胞壁肽聚糖的分类[J]. 微生物学通报, 1992, 19(3): 174-179.
- [3] 孟凡伦, 马桂荣, 孔健. 乳链球菌 SB900 胞壁肽聚糖的部分生物学活性[J]. 微生物学报, 1998, 38(5): 376-380.
- [4] 马西艺, 乐国伟, 施用晖, 等. 乳酸杆菌肽聚糖的分离鉴定及其免疫活性[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(6): 50-54.
- [5] 刘景圣, 蔡丹, 孙涛. 嗜酸乳杆菌细胞壁肽聚糖的分离提取[J]. 吉林农业大学学报, 2008, 30(4): 605-609.
- [6] 王静华, 赵洪涛, 汪以真. 细菌细胞壁肽聚糖的研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2004, 38(1): 38-40.
- [7] Sekine K, Ohta J, Onishi M, et al. Analysis of antitumor properties of effector cells stimulated with a cell wall preparation (WPG) of bifidobacterium infantis[J]. Biol pharm Bull, 1995, 18(1): 148-153.
- [8] 蓝景刚, 胡宏. 双歧杆菌及其表面分子的免疫增强作用[J]. 中国微生态学杂志, 1999, 11(3): 129-131.
- [9] 赵予秀, 彭虹, 左秀勤. 乳酸杆菌胞壁肽聚糖的佐剂作用及其抗感染效果[J]. 上海免疫学杂志, 1988, 8(1): 1-4.
- [10] 双杰, 张七斤, 张和平, 等. 乳酸杆菌肽聚糖对鸡新城疫油苗和禽流感油苗的免疫增强作用的研究[J]. 畜牧与饲料科学, 2008(2): 41-43.
- [11] 孟凡伦, 马桂荣, 孔健. 乳链球菌 SB900 肽聚糖对中国对虾免疫功能的影响[J]. 山东大学学报: 自然科学版, 1999, 34(1): 88-92.
- [12] 张璐一, 艾庆辉, 麦康森, 等. 肽聚糖对鲈鱼生长和非特异性免疫力的影响[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2008, 38(4): 551-556.
- [13] 许国焕, 吴月嫦, 陶家发. 两种多聚糖对彭泽鲫生

- 长影响及免疫促进作用的初步研究 [J]. 水利渔业 2002 22(4): 49-51.
- [14] Ishihara K ,Hayasaka K ,Yamazaki N. Current status of melanoma treatment with interferon ,cytokines and other biological response modifiers in Japan [J]. J Invest Dermatol 1989 92: 326-328.
- [15] Sekine K ,Watanab S E ,Ohta J ,et al. Induction and activation of tumoricidal cells in vivo and in vitro by the bacterial cell wall of bifidobacterium infantis [J]. Bifidobacteria Microflora 1994 13: 65-72.
- [16] Sun J ,Shi Y H ,Le G W ,et al. Distinct immune response induced by peptidoglycan derived from Lactobacillus sp [J]. World J Gastroenterol 2005 11(40): 6330-6337.
- [17] 蔡良真 李姝君 官成浓. 双歧杆菌完整肽聚糖的体外抗肿瘤作用及对大鼠大肠肿瘤的影响 [J]. 广东医学院学报 2005 23(5): 500-502.
- [18] 温晓庆 托娅 段智变 等. Lb. casei. Zhang 肽聚糖体内外抗肿瘤作用 [J]. 山西农业大学学报: 自然科学版 [J]. 2008 28(3): 353-356.
- [19] 杨平 刘宁 马玉彦. 双歧杆菌完整肽聚糖对实验性胃癌抑制作用的研究 [J]. 东北农业大学学报 2008 39(3): 96-99.

Research on Peptidoglycan of Bacterial Cell Wall

LIU Fang , YANG Yue-huan

(School of Biotechnology Engineering , Sichuan University of Science & Engineering , Zigong 643000 , China)

Abstract: Peptidoglycan is an unique composition of the real bacterial cell wall , because it plays a major role in the physiological functions of the bacterial cell wall and becomes the main subject of research on the bacterial cell wall at present. The chemical composition , structural feature , classification , separation and purification , biosynthesis , biological function , application prospect of peptidoglycan of the bacterial cell wall and so on are introduced.

Key words: peptidoglycan; separation and purification; biosynthesis; biological function