

血红蛋白源抗菌片段的研究进展

张东玲^{1,2,3,4} 关瑞章^{1,2,3,4} 黄文树^{2,4} 熊静^{2,4}

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 集美大学水产学院, 厦门 361021; 3. 中国科学院大学, 北京 100049; 4. 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 厦门 361021)

A REVIEW ON THE ANTIMICROBIAL FRAGMENTS DERIVED FROM HEMOGLOBIN

ZHANG Dong-Ling^{1,2,3,4}, GUAN Rui-Zhang^{1,2,3,4}, HUANG Wen-Shu^{2,4} and XIONG Jing^{2,4}

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Fishery College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. Engineer Research of Eel Modern industry Technology, Ministry of Education, Xiamen 361021, China)

关键词: 血红蛋白; 抗菌片段; 抗菌活性; 抗菌机制

Key words: Hemoglobin; Antimicrobial fragments; Antibacterial activity; Antibacterial mechanism

中图分类号: Q591.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2013)05-0945-12

抗菌肽也称宿主防御肽, 通常是指一类具有2—9个正电荷, 由12—100个氨基酸组成的阳离子肽, 它们由单独的基因编码, 发挥着独特的抗菌作用^[1]。迄今, 从哺乳动物、鸟类、两栖类、鱼类、昆虫和植物等各类生物中均分离得到抗菌肽, 已鉴定或推导并登陆的抗菌肽序列有2170条(2013年2月APD: <http://aps.unmc.edu/AP/about.php>)。抗菌肽多具有广谱抗病原的特点, 除具有传统的抗细菌、病毒、真菌、寄生虫的作用, 还有抗肿瘤、免疫调节或直接作为免疫佐剂、制备灭活疫苗等多重功能^[2—4]。抗菌肽主要包括4大类: ①单链无半胱氨酸残基的 α -螺旋, 或由无规则卷曲连接的两段 α -螺旋组成的肽; ②富含氨基酸残基但不含半胱氨酸残基的抗菌肽; ③含有1个二硫键的抗菌多肽; ④有2个或2个以上二硫键、具有 β -折叠结构的抗菌肽。除上述4类通常所称的抗菌肽, 还有一类具有抗菌活性的小肽, 统称为“Peptides or fragments derived from proteins of other function”, 如血红蛋白、组蛋白^[5]、血蓝蛋白^[6]、乳铁蛋白^[7]和神经肽^[8]等。

血红蛋白最初被定位是一种重要的呼吸蛋白, 广泛分布于脊椎动物和部分无脊椎动物, 以及细菌、真菌和植物。后来发现血红蛋白除载氧作用以外, 还有众多生物学

特性, 如促生长激素释放、促肾上腺皮质激素释放、阿片样活性、血管紧张素转换酶抑制活性等^[9—11]。尤其血红蛋白可形成多个抗菌片段的特点, 已成为国内外学者研究的热点。因此, 本文重点阐述血红蛋白及其片段的抗菌特性, 以期对今后血红蛋白及其片段的生理特性和功能等研究提供重要参考。

1 血红蛋白源抗菌片段的研究

1.1 人类血红蛋白源抗菌片段

人类血红蛋白片段抗菌谱非常广, 有抗革兰氏阳性菌, 如藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、金黄色葡萄球菌(*Streptococcus aureus*)、山羊葡萄球菌(*S. carnosus*)、粪链球菌(*Streptococcus faecalis*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*), 抗革兰氏阴性菌, 如大肠杆菌(*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、沙门氏菌属(*Salmonella* sp.)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*), 抗真菌, 如白色念珠菌(*Candida Albicans*)。不同的血红蛋白源抗菌片段对不同生物抗菌活性差异很大(表1)。对已报道具有抗菌活性的Hb α 和Hb β 及其片段, 以及Hb γ 片段的分子量、

收稿日期: 2012-07-09; 修订日期: 2013-03-08

基金项目: 农业部(农业)公益性行业科研专项(nyhyzx07-043); 福建省海洋与渔业厅重点项目(201212140006); 福建省教育厅项目(JA09157); 厦门市工程技术研究中心创新项目(3502Z20110014); 厦门市科技局重点项目(3502Z20103023)资助

作者简介: 张东玲(1977—), 女, 黑龙江鹤岗人; 博士研究生, 讲师; 研究方向为鱼类免疫学。E-mail: zhangdongling@jmu.edu.cn

通信作者: 关瑞章(1953—), 男, 福建莆田人, 教授; 研究方向为渔业水体生态与病害学。E-mail: rzguan@jmu.edu.cn

表 1 人类血红蛋白抗菌片段结构特征和对主要细菌的 MIC 值

Tab.1 The structural characteristics of antibacterial fragments derived from human hemoglobin and MIC against main bacterial ($\mu\text{mol/L}$)

抗菌片段 Antibacterial fragment	分子量 Molecular weight	电荷 Net charge	疏水性 Hydrophobic ratio	二级结构预测 Prediction of secondary structure	对主要细菌的 MIC 值 ($\mu\text{mol/L}$)						参考文献 References
					革兰氏阳性菌 (G^+)			革兰氏阴性菌 (G^-)		真菌	
					粪肠球菌 <i>S. faecalis</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	藤黄微球菌 <i>M. luteus</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	肺炎克雷伯菌 <i>K. pneumoniae</i>	白色念珠菌 <i>C. albicans</i>	
Hba 1—32	3321.76	0	43%	71.88% α 螺旋; 3.12%延伸链; 6.25% β 转角; 18.75%任意卷曲 47.73% α 螺旋;	> 30	> 30	ND	> 30	ND	> 30	16, 19
Hba 33—76	4755.38	0	38%	9.09%延伸链; 9.09% β 转角; 34.09%任意卷曲 56.58% α 螺旋;	21	> 73.6	ND	21	ND	14.7	16
Hba 1—76	8079.13	0	40%	6.58%延伸链; 6.58% β 转角; 30.26%任意卷曲 67.69% α 螺旋;	37.1	> 58.2	ND	> 58.2	ND	> 58.2	16
Hba 77—141	7023.24	+2	49%	6.15 延伸链; 4.62% β 转角; 21.54 任意卷曲 60% α 螺旋;	> 14.2	> 14.2	ND	> 14.2	ND	4.3	16
Hba 1—20	2043.35	+2	45%	5% 延伸链; 5% β 转角; 30%任意卷曲 64% α 螺旋;	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19
Hba 1—25	2520.83	+1	40%	4%延伸链; 12% β 转角; 20%任意卷曲 53.85% α 螺旋;	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19
Hba 1—26	2591.91	+1	42%	3.85%延伸链; 19.23% β 转角; 23.08%任意卷曲 51.85% α 螺旋;	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19
Hba 1—27	2721.02	0	40%	3.70%延伸链; 18.52% β 转角; 25.93%任意卷曲 57.14%螺旋;	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19
Hba 1—28	2792.1	0	42%	3.57%延伸链; 17.86% β 转角; 21.43%任意卷曲 65.52% α 螺旋;	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19
Hba 1—29	2905.26	0	44%	3.45%延伸链; 10.34% β 转角; 20.69%任意卷曲 74.19% α 螺旋;	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19
Hba 1—31	3190.56	0	41%	3.23%延伸链; 6.45% β 转角; 16.13%任意卷曲 81.82% α 螺旋;	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19
Hba 1—33	3468.94	0	45%	3.03%延伸链; 15.15%任意卷曲	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19

续表

抗菌片段 Antibacterial fragment	分子量 Molecular weight	电荷 Net charge	疏水性 Hydrophobic ratio	二级结构预测 Prediction of secondary structure	对主要细菌的 MIC 值 ($\mu\text{mol/L}$)						参考文献 References
					革兰氏阳性菌 (G^+)			革兰氏阳性菌 (G^-)		真菌	
					粪肠球菌 <i>S. faecalis</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	藤黄微球菌 <i>M. luteus</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	肺炎克雷伯菌 <i>K. pneumoniae</i>	白色念珠菌 <i>C. albicans</i>	
Hba 1—40	4237.85	+1	42%	65% α 螺旋; 2.5%延伸链; 5% β 转角; 27.50%任意卷曲	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19
Hba 17—31	1430.5	-2	35%	100%任意卷曲	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19
Hba 18—44	2923.31	-1	38%	57.69% α 螺旋; 7.69%延伸链; 34.62%任意卷曲	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19
Hba 35—56	2483.77	+1	27%	9.09%延伸链; 9.09% β 转角; 59.09%任意卷曲	293	222	281	105	146	> 300	19
Hba 35—58	2677.96	+1	25%	4.17% α 螺旋; 20.83%延伸链; 16.67% β 转角; 58.33%任意卷曲	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19
Hba 35—60	2863.19	+2	23%	3.85% α 螺旋; 15.38%延伸链; 23.08% β 转角; 57.69%任意卷曲	ND	ND	ND	ND	ND	ND	16
Hba 35—72	4054.54	+2	34%	42.11% α 螺旋; 5.26%延伸链; 10.53% β 转角; 42.11%任意卷曲	ND	ND	ND	ND	ND	ND	16
Hba 35—77	4606.16	0	34%	46.51% α 螺旋; 4.65%延伸链; 9.30% β 转角; 39.53%任意卷曲	ND	ND	ND	ND	ND	ND	16
Hba 35—78	4720.27	0	34%	43.18% α 螺旋; 4.55%延伸链; 18.18% β 转角; 34.09%任意卷曲	ND	ND	ND	ND	ND	ND	16
Hba 35—79	4791.35	0	35%	42.22% α 螺旋; 4.44%延伸链; 11.11% β 转角; 42.22%任意卷曲	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19
Hba 35—80	4904.51	0	36%	45.65% α 螺旋; 4.35%延伸链; 13.04% β 转角; 36.96%任意卷曲	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19
Hba 35—90	5964.68	0	37%	58.93% α 螺旋; 3.57%延伸链; 8.93% β 转角; 28.57%任意卷曲	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19
Hba 35—97	6752.61	0	38%	52.38% α 螺旋; 3.17%延伸链; 9.52% β 转角; 34.92%任意卷曲	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19

续表

抗菌片段 Antibacterial fragment	分子量 Molecular weight	电荷 Net charge	疏水性 Hydrophobic ratio	二级结构预测 Prediction of secondary structure	对主要细菌的 MIC 值 ($\mu\text{mol/L}$)						参考文献 References
					革兰氏阳性菌 (G^+)			革兰氏阴性菌 (G^-)		真菌	
					粪肠球菌 <i>S. faecalis</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	藤黄微球菌 <i>M. luteus</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	肺炎克雷伯菌 <i>K. pneumoniae</i>	白色念珠菌 <i>C. albicans</i>	
Hba 106—141	3843.49	+1	50%	77.78% α 螺旋; 2.78% β 转角; 19.44%任意卷曲	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19
Hba 107—140	3574.14	0	50%	79.41% α 螺旋; 2.94% β 转角; 17.65%任意卷曲	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19
Hba 107—141	3687.30	0	51%	80% α 螺旋; 2.86% β 转角; 17.14%任意卷曲	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19
Hba 110—131	2281.61	-1	54%	68.18% α 螺旋; 31.82%任意卷曲	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19
Hba 110—141	3416.93	+1	46%	68.75% α 螺旋; 3.12% β 转角; 28.12%任意卷曲	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19
Hba 32—93	6724.70	+1	41%	54.84% α 螺旋; 9.68%延伸链; 12.90% β 转角; 22.58%任意卷曲	ND	ND	ND	ND	ND	ND	21
Hba 33—95	6799.71	0	39%	52.38% α 螺旋; 6.35%延伸链; 9.52% β 转角; 31.75%任意卷曲	ND	ND	ND	ND	ND	ND	22
Hba 77—141	7023.24	+2	49%	67.69% α 螺旋; 6.15%延伸链; 4.62% β 转角; 21.54%任意卷曲	ND	ND	ND	ND	ND	ND	20
Hb β 1—55	6045.89	-4	43%	43.64% α 螺旋; 14.55%延伸链; 9.09% β 转角; 32.73%任意卷曲	1.3	26.5	ND	0.8	ND	4.1	16
Hb β 56—146	9791.41	+3	45%	76.92% α 螺旋; 2.20%延伸链; 10.99% β 转角; 9.89%任意卷曲	1.5	9.9	ND	100.1	ND	2.6	16, 20
Hb β 56—72	1732.05	+4	35%	5.88% α 螺旋; 41.18%延伸链; 11.76% β 转角; 41.18%任意卷曲	1443.4	28.9	ND	1.2	ND	5.8	16
Hb β 116—146	3404.886	+2	41%	64.52% α 螺旋; 6.45% β 转角; 29.03%任意卷曲	2937	ND	ND	5.9	ND	4405.4	16
Hb β 1—30	3156.55	-2	40%	40.00% α 螺旋; 10.00%延伸链; 13.33% β 转角; 36.67%任意卷曲	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19
Hb β 16—30	1499.64	-1	33%	100%任意卷曲	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19
Hb β 43—83	4210.68	0	36%	31.71% α 螺旋; 17.07%延伸链; 14.63% β 转角; 36.59%任意卷曲	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19

续表

抗菌片段 Antibacterial fragment	分子量 Molecular weight	电荷 Net charge	疏水性 Hydrophobic ratio	二级结构预测 Prediction of secondary structure	对主要细菌的 MIC 值 ($\mu\text{mol/L}$)						参考文献 References
					革兰氏阳性菌 (G^+)			革兰氏阴性菌 (G^-)		真菌	
					粪肠球菌 <i>S. faecalis</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	藤黄微球菌 <i>M. luteus</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	肺炎克雷伯菌 <i>K. pneumoniae</i>	白色念珠菌 <i>C. albicans</i>	
Hb β 46—64	1882.13	0	31%	15.79%延伸链; 21.05% β 转角; 63.16%任意卷曲 68.18% α 螺旋;	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19
Hb β 113—146	4803.67	+3	52%	9.09%延伸链; 6.82% β 转角; 15.91%任意卷曲 66.67% α 螺旋;	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19
Hb β 115—146	4500.31	+3	52%	9.52%延伸链; 7.14% β 转角; 16.67%任意卷曲 61.11% α 螺旋;	140	61	48	27	37	> 300	19,23
Hb β 111—146	3890.54	+2	50%	11.11%延伸链; 8.33% β 转角; 19.44%任意卷曲 94.12% α 螺旋;	25.6	38.5	8	16	51.3	ND	19,17
Hb γ 130—146	1869.15	+2	47%	5.88%任意卷曲	> 300	77.5	1100	52	> 130	ND	17

注: ND 表示没有检测对这株菌的 MIC

Note: ND shows not to determine MIC to the bacterium

电荷、抗菌活性和疏水性用 http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction_main.php 软件分析, 二级结构用 http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=n_psa_sopma.html 软件分析, 结果如表 1 所示, 其中 Hb α 抗菌片段较多, 几乎任意裂解片段都具有抗菌活性, Hb β 相对少一些, Hb γ 只有一条, 但人体可能会存在很多我们还没有发现的 Hb β 和 Hb γ 抗菌片段。血红蛋白具有抗菌活性的研究起始非常早, Hobson, *et al.* 1958 年就发现人血红蛋白具有抗菌活性, 并从 pH、温度、孵育时间等多个方面探讨了血红蛋白抑菌或杀菌作用的强度, 血红蛋白对大肠杆菌最小抑菌浓度(MIC)在 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 或更小, 在酸性条件下抗菌效果最佳^[12]。这与人类阴道酸性环境是不谋而合的, 后续的研究结果也证明了人类血红蛋白源抗菌片段多存在月经、阴道和子宫恶露, 推测这些抗菌片段可能参与保护子宫和阴道。人类血红蛋白片段具有抗菌活性的研究成果, 一经公布就引起学术界的质疑, 因为当时一些学者认为血红蛋白通过提供铁离子或干扰白细胞的氧气代谢机制而抑制白细胞杀菌作用, 进而可能促进细菌的生长。事实上, 有些血红蛋白片段的确是促进某些细菌生长, 但是绝大多数血红蛋白片段是抑菌或杀菌的^[13-15]。此后, 越来越多研究证明了血红蛋白源片段具有抗菌活性, 并命名为 hemocidins, 对革兰氏阳性、阴性细菌和真菌均起作用^[16-18]。Cornelia, *et al.* 应用离子交换和反相高效液相色谱, 从人类胎盘纯化得到血红蛋白

源抗菌片段 Hb β 111—146 和 Hb γ 130—246, 第一次证明了人体内存在天然的血红蛋白源抗菌片段^[17]。此后 Mak, *et al.* 在女性月经血中分离纯化得到 27 个血红蛋白源抗菌片段, 均对大肠杆菌有抑菌或杀菌作用^[19]。Deng, *et al.* 从子宫内膜黏液分离纯化得到 Hb α 32—93, 并建立了感染大肠杆菌的大鼠阴道炎模型, 表明血红蛋白源抗菌片段可以减轻由大肠杆菌导致的大鼠阴道炎^[21]。

1.2 其他哺乳动物血红蛋白源抗菌片段

对于其他哺乳动物血红蛋白源抗菌片段, 研究最多的是牛血红蛋白, 其分子量、电荷、疏水性、结构特征和抗菌活性如表 2, 最小抑菌浓度可达 $1 \mu\text{mol/mL}$ 。Fogaca, *et al.* 1999 年从寄生于牛体的脾肠内容物里分离纯化得到具有抗菌活性的牛血红蛋白源片段, 认为是脾利用宿主血红蛋白片段的抗菌活性来防御病原微生物的侵害^[24]。Froidevaux, *et al.* 2001 年首次应用胃蛋白酶水解牛血红蛋白到 90%程度, 得到一个能杀灭藤黄微球菌 A270 的 Hb α 片段^[25]; 2005 年水解牛血红蛋白到 3%, 分离纯化得到第二个 Hb α 抗菌片段^[26]; 2006 年又分离纯化得到 3 个 Hb α 和 1 个 Hb β 抗菌片段^[27]; 2008 年再次报道分离纯化到 24 个新的牛血红蛋白源抗菌片段^[28]; 2011 年在标准胃蛋白酶水解液中加入 40%甲醇、30%乙醇、20%丙醇、10%丁醇以改变牛血红蛋白二级结构, 水解血红蛋白得到 26 段血红蛋白源抗菌片段, 其中 13 段是新发现的^[29]; 随后又发现牛 Hb α 最小抗菌片段为 KYR, Hb β

表 2 牛血红蛋白源抗菌片段结构特征
Tab. 2 The structural characteristics of antibacterial fragments derived from bovine hemoglobin

抗菌片段 Antibacterial fragment	分子量 Molecular weight	电荷 Net charge	疏水性 Hydrophob- ic ratio	二级结构预测 Prediction of secondary structure	对主要细菌的 MIC 值 ($\mu\text{mol/L}$)				参考 文献 Refer- ences
					革兰氏阳性菌 (G^+)		革兰氏阳性菌 (G^+)		
					藤黄微 球菌 <i>M.luteus</i>	无害李 斯特菌 <i>L. innocua</i>	大肠 杆菌 <i>E. coli</i>	肠炎沙 门氏菌 <i>S. enteritidis</i>	
Hba 33—61	3206.6	+2	31%	3.45% α 螺旋; 24.29% 延伸链; 10.34% β 转角; 62.07% 任意卷曲	5	ND	ND	ND	24
Hba 1—23	2236.51	+1	47%	52.17% α 螺旋; 8.70% 延伸链; 17.39% β 转角; 21.74% 任意卷曲	100	54	54	27	25
Hba 1—27	2656.93	0	44%	59.26% α 螺旋; 7.41% 延伸链; 18.52% β 转角; 29.81% 任意卷曲	38	27	54	38	28
Hba 1—28	2728.01	0	46%	67.86% α 螺旋; 7.29% 延伸链; 29.29% β 转角; 10.71% 任意卷曲	54	27	54	27	28
Hba 1—29	2841.17	0	48%	68.97% α 螺旋; 6.90% 延伸链; 13.79% β 转角; 10.34% 任意卷曲	54	27	54	27	28
Hba 1—32	3257.67	0	46%	71.88% α 螺旋; 6.25% 延伸链; 12.50% β 转角; 9.38% 任意卷曲	90	38	154	38	28, 29
Hba 1—33	3404.85	0	48%	72.73% α 螺旋; 6.06% 延伸链; 12.12% β 转角; 9.09% 任意卷曲	73	73	146	ND	29
Hba 1—46	4960.65	+1	43%	58.70% α 螺旋; 4.35% 延伸链; 10.87% β 转角; 26.09% 任意卷曲	100	25	100	ND	29
Hba 3—36	2597.94	-1	50%	67.65% α 螺旋; 11.76% β 转角; 20.59% 任意卷曲	70	35	70	ND	29
Hba 33—45	1573.82	+1	30%	100% 任意卷曲	90	38	154	38	28, 29
Hba 33—46	1721.00	+1	35%	100% 任意卷曲	73	73	146	ND	29
Hba 33—66	3620.13	+2	41%	32.35% α 螺旋; 11.76% 延伸链; 11.76% β 转角; 44.12% 任意卷曲	9	1	1	5	28
Hba 33—83	5404.29	-1	41%	49.02% α 螺旋; 7.84% 延伸链; 9.80% β 转角; 33.33% 任意卷曲	45	80	80	45	28

续表

抗菌片段 Antibacterial fragment	分子量 Molecular weight	电荷 Net charge	疏水性 Hydrophob- ic ratio	二级结构预测 Prediction of secondary structure	对主要细菌的 MIC 值 (μmol/L)				参考 文献 Refer- ences
					革兰氏阳性菌 (G ⁺)		革兰氏阴性菌 (G ⁻)		
					藤黄微 球菌 <i>M.luteus</i>	无害李 斯特菌 <i>L. innocua</i>	大肠 杆菌 <i>E. coli</i>	肠炎沙 门氏菌 <i>S. enteritidis</i>	
Hba 33—97	6980.92	-1	40%	50.77%α 螺旋; 6.15%延伸链; 6.15%β 转角; 36.92%任意卷曲	90	49	90	90	28
Hba 33—98	7128.10	-1	40%	50%α 螺旋; 7.58%延伸链; 6.06%β 转角; 36.36%任意卷曲	90	49	90	90	28
Hba 34—46	1573.82	+1	30%	100%任意卷曲	5	1	9	5	28
Hba 34—65	3359.80	+2	37%	18.75%α 螺旋; 18.75%延伸链; 18.75%β 转角; 43.75%任意卷曲	9	9	5	ND	29
Hba 34—66	3472.96	+2	39%	33.33%α 螺旋; 9.09%延伸链; 9.09%β 转角; 48.48%任意卷曲	5	1	9	5	28
Hba 34—83	5256.96	-1	40%	50%α 螺旋; 6%延伸链; 10%β 转角; 34%任意卷曲	45	80	80	45	28
Hba 34—98	6980.92	-1	40%	50.77%α 螺旋; 6.15%延伸链; 4.62%β 转角; 38.46%任意卷曲	90	49	90	90	28
Hba 36—45	1226.41	+1	20%	100%任意卷曲	1	1	9	9	28
Hba 36—97	6633.50	-1	38%	53.23%α 螺旋; 3.23%延伸链; 9.68%β 转角; 33.87%任意卷曲	49	49	87	87	28
Hba 37—46	1226.41	+1	20%	100%任意卷曲	1	1	9	9	28
Hba 37—98	6633.50	-1	38%	53.23%α 螺旋; 9.68%延伸链; 9.68%β 转角; 27.42%任意卷曲	49	49	87	87	28
Hba 67—106	4316.98	-2	43%	58.97%α 螺旋; 12.82%延伸链; 5.13%β 转角; 23.08%任意卷曲	141	35	35	ND	29
Hba 73—105	3639.18	-2	42%	42.42%α 螺旋; 15.15%延伸链; 6.06%β 转角; 36.36%任意卷曲	43	43	171	ND	29
Hba 86—109	2745.31	+2	50%	12.50%α 螺旋; 45.83%延伸链; 8.33%β 转角; 33.33%任意卷曲	45	11	11	ND	29

续表

抗菌片段 Antibacterial fragment	分子量 Molecular weight	电荷 Net charge	疏水性 Hydrophob- ic ratio	二级结构预测 Prediction of secondary structure	对主要细菌的 MIC 值 (μmol/L)				参考 文献 Refer- ences
					革兰氏阳性菌 (G ⁺)		革兰氏阳性菌 (G ⁺)		
					藤黄微 球菌 <i>M.luteus</i>	无害李 斯特菌 <i>L. innocua</i>	大肠 杆菌 <i>E. coli</i>	肠炎沙 门氏菌 <i>S. enteritidis</i>	
Hbα 96—106	1270.54	+1	54%	100%任意卷曲	24	24	46	ND	29
Hbα 99—105	796.96	+1	42%	100%任意卷曲	39.2	39.2	78.4	ND	29
Hbα 99—106	910.12	+1	50%	100%任意卷曲	34	34	68	ND	29
Hbα 100—105	668.79	0	50%	100%任意卷曲	46.78	187.1	46.78	ND	29
Hbα 106—141	3888.49	+1	44%	11.11%β 转角; 16.67%任意卷曲 63.64%α 螺旋;	64	32	64	ND	29
Hbα 107—128	2341.66	-1	45%	4.55%延伸链; 9.09%β 转角; 22.73%任意卷曲 70.37%α 螺旋;	53	53	26	ND	29
Hbα 107—133	2826.21	-1	48%	3.70%延伸链; 7.41%β 转角; 18.52%任意卷曲 73.33%α 螺旋;	9	37	73	37	28, 29
Hbα 107—136	3139.61	-1	50%	3.33%延伸链; 6.67%β 转角; 16.67%任意卷曲 68.57%α 螺旋;	76	38	76	76	26-29
Hbα 107—141	3775.33	+1	42%	2.86%延伸链; 11.43%β 转角; 17.29%任意卷曲	87	43	87	87	27-29, 31
Hbα 133—141	1054.21	+2	22%	100%任意卷曲	15	2	8	8	27, 28, 31
Hbα 137—141	653.72	+1.91	*	100%任意卷曲 76.19%α 螺旋;	9	1	9	5	27-29, 31
Hbα 110—141	4539.27	+1	45%	9.52%β 转角; 29.29%任意卷曲	72	36	72	ND	15
Hbα138—141	552.61	+1.91	*	100%任意卷曲	4	1	4	4	31
Hbα139—141	465.53	+1.91	*	100%任意卷曲 51.02%α 螺旋;	2	1	1	1	31
Hbβ 77—125	5425.35	-2	48%	20.41%延伸链; 18.37%β 转角; 10.20%任意卷曲 93.33%α 螺旋;	—	—	183	ND	29
Hbβ 62—91	3296.74	0	36%	6.67%β 转角;	18	5	5	ND	29
Hbβ 1—13	1381.61	-1	61%	100%任意卷曲 60%α 螺旋;	4	6	4	6	28
Hbβ 1—30	3176.68	-1	50%	10%延伸链; 10%β 转角; 20%任意卷曲 50%α 螺旋;	45	45	45	45	27, 28
Hbβ 79—104	2935.35	-2	42%	11.54%延伸链; 19.23%β 转角; 19.23%任意卷曲	170	42	170	ND	29
Hbβ 114—124	1259.43	+1	36%	100%任意卷曲	6	6	12	ND	29

续表

抗菌片段 Antibacterial fragment	分子量 Molecular weight	电荷 Net charge	疏水性 Hydrophob- ic ratio	二级结构预测 Prediction of secondary structure	对主要细菌的 MIC 值 (μmol/L)				参考 文献 Refer- ences
					革兰氏阳性菌 (G ⁺)		革兰氏阴性菌 (G ⁻)		
					藤黄微 球菌 <i>M.luteus</i>	无害李 斯特菌 <i>L. innocua</i>	大肠 杆菌 <i>E. coli</i>	肠炎沙 门氏菌 <i>S. enteritidis</i>	
Hbβ 129—145	3550.05	+2	46%	75%α 螺旋; 6.25%β 转角; 18.75%任意卷曲	85	85	73	ND	29, 30
Hbβ 121—145	2747.16	+1	52%	76%α 螺旋; 24%任意卷曲	85	73	73	73	28, 30
Hbβ 126—145	2195.47	+1	50%	95%α 螺旋; 5%任意卷曲	71	35	35	35	27, 28, 30
Hbβ 140—145	795.9	+1	33%	100%任意卷曲	9	10	2	9	28, 30
Hbβ 143—145	474.5	+1.07	*	100%任意卷曲	4	1	4	1	30

注: 表示没有活性; ND 表示没有检测对这种菌的 MIC; *表示片段太短, 无法判断疏水性

Note: shows no antibacterial activity; ND shows not to determine antibacterial activity to the bacterium; * shows fragment is too short to estimate its hydrophobic ratio

最小抗菌片段为 RYH^[30, 31]。由此, 我们不难发现牛血红蛋白如同人类血红蛋白一样是“血红蛋白源抗菌片段库”。兔子阴道组织结构与人类极其相似, 因此兔子是临床评估阴道杀菌药物首选动物模型。Patgaonkar, *et al.* 从兔阴道液内纯化得到一个 Hbα 抗菌片段, 并合成这个由 25 个氨基酸组成的兔阴道液血红蛋白 α 链 RVFHbαP (Rabbit Vaginal Fluid Hbα Peptide), 其对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞杆菌、化脓性链球菌、白色念球菌均具有抗菌活性, RT-PCR 和免疫组化分析 RVFHbαP 在兔阴道内大量表达; 体外实验表明 RVFHbαP 能够阻碍由脂多糖(LPS)引起的阴道细胞炎症^[32]。此外, 马的完整血红蛋白也具有抗菌活性^[16]。猪血中也存在抗菌物质, 但并没有提纯到单一的抗菌肽段^[33, 34]。

1.3 爬行类血红蛋白源抗菌片段

最近, 一个非常有趣的问题引起各国学者的注意, 鳄鱼即使生活在沼泽地里, 一种病原高度滋生的地方, 也不会感染疾病; 另外鳄鱼之间或与其他动物争斗后, 伤口可以在短时间内自愈, 甚至不会受病原的侵染, 这说明鳄鱼体内应该含有一定的抗菌物质。确实, 已有研究发现美洲鳄(*Alligator mississippiensis*)血浆能够抑制细菌和病毒的生长^[35-37]。Craig, *et al.* 的研究表明美洲鳄完整的血红蛋白具有抗菌活性^[17]。Hoffman, *et al.* 也发现美洲鳄完整的 Hbα 和 Hbβ 链可以抑制大肠杆菌、铜绿假单胞菌及白色念球菌的生长^[38]。Srihongthong, *et al.* 研究发现暹罗鳄(*Crocodylus siamensis*)完整的血红蛋白及 Hbα、Hbβ 链片段对枯草芽孢杆菌 TISTR008、枯草芽孢杆菌 ATCC6633、解淀粉芽孢杆菌 TISTR1045、短小芽孢杆菌 TISTR905 均具有明显的抗菌活性^[39], 结构特征如表 3。

1.4 鱼类血红蛋白源抗菌片段

上述血红蛋白源抗菌片段研究均仅涉及它们的抗菌和真菌特性, 尚不清楚其是否抗寄生虫。Anirudh,

et al. 从叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*, Rafinesque)鳃中分离纯化得到三个抗菌片段: HbβP-1、HbβP-2 和 HbβP-3, 其中 HbβP-1 抗菌活性最强, 其次是 HbβP-2 和 HbβP-3, HbβP-1 不仅能够抑制或杀灭革兰氏阴性菌, 而且对小瓜子虫的滋养体有致死作用^[40]。Fernandes, *et al.* 发现虹鳟红细胞内包含抗菌活性物质, 但没有提纯到单一的物质^[41]。我们实验室从日本鳗肝脏内分离纯化得到一个由 22 个氨基酸组成的 Hbα 抗菌片段, 并发现其对爱德华氏菌具有明显的抗菌活性, 在浓度为 27 μg/mL 时, 对爱德华氏菌有 88.64%(杀菌指数 Ki)抑菌作用, 人工合成的 Hbα 抗菌片段在浓度为 100 μg/mL 时对 6 株革兰氏阴性菌有明显抑菌或杀菌作用^[42]。

1.5 贝类血红蛋白源抗菌片段

大多数贝类含有与铜离子结合的血蓝蛋白, 只有部分贝类含有血红蛋白, 主要包括毛蚶、泥蚶、魁蚶、厚壳蛤等^[43]。对于完整的血蓝蛋白及血蓝蛋白片段具有抗菌活性的研究较为普遍, 但是对于贝类血红蛋白抗菌活性的研究较为少见。荆昭曾研究发现毛蚶 Hb₁、Hb₂ 对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、四联微球菌有抑菌活性^[44]。Bao, *et al.* 研究发现泥蚶在副溶血弧菌、脂多糖(LPS)、肽聚糖(PGN)刺激下 12h 后血细胞内 Hb 表达量显著提高, 表明 Hb 可能涉及泥蚶免疫学反应^[45]。泥蚶血红蛋白是否具有直接抗菌功能还需进一步验证。

2 血红蛋白源抗菌片段的抗菌机制研究

目前, 对于血红蛋白源抗菌片段的抗菌机制尚不明确, 国内外研究主要集中在这些片段的结构、长度及蛋白酶对血红蛋白的水解作用。内源性抗菌肽是由胚系基因编码的内源性活性肽分子, 抗菌机制涉及三个显著特征: α

螺旋结构、阳离子电荷和高含量的疏水性氨基酸,这三个特征对于抗菌肽抗菌活性是至关重要的,如 mellitin、cecropinspardaxin 和 LL-37。如表 1、2、3 所示,一些血红蛋白源抗菌片段带有正电荷和大量(>35%)的疏水性氨基酸,同时二级结构含有大比例的 α 螺旋结构,该类抗菌肽通过静电作用,带有正电荷的抗菌肽与带有负电荷的细胞膜结合,肽分子中的疏水基团插到磷脂双分子层的疏水核心部分,并以与膜表面垂直的方式排列,肽的亲水区域则形成具有极性的孔或通道,外界的水分即可渗入细胞内部,细胞质也可渗透到外部,致使细菌死亡;但有一些血红蛋白源抗菌片段带有正电荷和少量(<35%)的疏水氨基酸,却是任意卷曲结构,这类抗菌肽可能在与细胞膜相结合的时候可以形成 α 螺旋结构^[46, 47];还有一些血红蛋白源抗菌片段不带电荷或带有负电荷,片段很短,其组成和结构与典型的 α 螺旋抗菌肽抗菌具有显著差异,探索这类片段的抗菌机制可能会带来具有原始创

新意义的发现。

Mak, *et al.* 提出血红蛋白源抗菌片段抗菌活性可能与片段的长度有关,一般要长于 16 个氨基酸,因为太短的片段可能会丧失抗菌活性,甚至会促进细菌的生长,如来源于牛血红蛋白的包含 5 个氨基酸的片段能够促进恶臭假单胞菌的生长^[18, 19, 48]。这也许是因为较长的片段有利于形成 α 螺旋结构,但是如表 1、2、3 所示,一些短的片段其尽管没有形成 α 螺旋结构,却比长片段的抗菌性更强,抗菌机制尚不明确。血红蛋白片段发挥抗菌作用有可能与机体的一些蛋白酶水解作用相关, Ivanov, *et al.* 提出一个“组织特异性肽库”概念,推测血红蛋白可能在红细胞内降解,然后被不同的组织蛋白酶水解成多个片段^[49-51]。随后 Mak, *et al.* 进一步研究表明基质金属蛋白酶和白细胞蛋白酶直接负责组织消化和形成月经排放物。Cornelia, *et al.* 也证实酶解作用发生在红细胞内部^[17]。本实验室分离到的 Hba 片段经 http://au.expasy.org/tools/peptide_cutter/ 软件分析,推导糜蛋白酶可能参与蛋白水解作用。

表 3 暹罗鳄血红蛋白源抗菌片段结构特征

Tab. 3 The structural characteristics of antibacterial fragments derived from *C. siamensis* hemoglobin

抗菌片段 Antibacterial fragment	分子量 Molecular weight	电荷 Net charge	疏水性 Hydrophobic ratio	二级结构预测 Prediction of secondary structure	参考文献 Reference
Hba 1—19	2022.37	+1	52%	57.89% α 螺旋; 10.53%延伸链; 5.26% β 转角; 26.32%任意卷曲	39
Hba 1—13	1377.58	0	46%	100%任意卷曲	39
Hba 16—26	1173.29	-1	36%	100%任意卷曲	39
Hb β 15—22	991.11	0	50%	100%任意卷曲	39
Hba 67—72	705.73	-1	33%	100%任意卷曲	39
Hb β 69—80	1260.37	-1	41%	100%任意卷曲	39
Hb β 69—82	1259.72	0	42%	100%任意卷曲	39
Hba 107—121	1542.81	-1	46%	100%任意卷曲	39
Hba 107—124	1838.11	-1	44%	100%任意卷曲	39
Hba 107—128	2341.71	-1	45%	100%任意卷曲	39
Hba 110—123	1453.63	-1	35%	100%任意卷曲	39
Hba 110—129	2157.47	-1	40%	100%任意卷曲	39
Hb β 115—124	1112.26	0	40%	100%任意卷曲	39

3 小结与展望

血红蛋白分布广泛,可以形成许多抗菌片段,构成一个巨大的抗菌肽库,在抗菌药物开发中具有广阔的应用前景。然而,对于血红蛋白源抗菌片段的研究还需进一步深入探讨以下几个问题:

首先,血红蛋白源抗菌片段的实际应用,尤其对人体,需谨慎。血红蛋白源抗菌片段可以看做是一种理想的抗阴道病原微生物的抗生素替代品,但前期研究主要应用在大鼠和兔子,其可能产生的毒副作用未知。且其应用细节,如给药时间及给药次数仍需进一步研究。另外,天然获得的血红蛋白源抗菌片段非常有限,由于片段短,原核或真核表达单个抗菌片段非常困难,下一步可否对两个或多个抗菌片段进行融合表达,以得到抗菌活性更好的片段,同时又

能大量获得以便实际应用,仍需进一步研究。

其次,血红蛋白源抗菌片段抗菌机制有待进一步深入研究,两个信号传导途径,即 Toll 途径和 Imd 途径控制着抗菌肽的表达, Toll 途径主要由革兰氏阳性细菌和真菌激活,并产生防卫素等抗菌肽;而 Imd 途径主要应答革兰氏阴性细菌的侵染,并控制抗革兰氏阴性细菌的抗菌肽基因的表达。因此血红蛋白源抗菌片段抗菌机制下一步可以从这两个途径入手。

此外,鱼类是目前最大的一个脊椎动物群体,其血红蛋白源抗菌片段的研究非常有限,是否鱼类也如同哺乳动物一样具有多个血红蛋白源抗菌片段?仍需进一步探索。目前,鱼类的寄生虫疾病仍是养殖病害中的一个难于攻克的难题,因此,鱼类血红蛋白源抗菌片段的抗菌及抗寄生虫作用值得进一步研究。

参考文献:

- [1] Jenssen H, Hamill P, Hancock R E W. Peptide antimicrobial agents [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2006, **19**(3): 491—511
- [2] Gao Yu, Chen C F, Li D P, *et al.* Clone, expression and antimicrobial activity analysis of hepcidin from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **7**(4): 799—803 [高宇, 陈昌福, 李大鹏, 等. 中华鲟抗菌肽 Hepcidin 的克隆、表达及其抗菌活性分析. *水生生物学报*, 2012, **7**(4): 799—803]
- [3] Bell A. Antimalarial peptides: the long and the short of it [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2011, **17**(25): 2719—2731
- [4] Rajanbabu V, Chen J Y. Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future [J]. *Peptides*, 2011, **32**(2): 415—420
- [5] Kathryn E Pavia, Spinella S A, Elmore D E. Novel histone-derived antimicrobial peptides use different antimicrobial mechanisms [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, **1818**(3): 869—876
- [6] Lee S Y, Lee B L, Söderhäll K. Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* [J]. *Biological Chemistry*, 2003, **278**(10): 7927—7933
- [7] Tasumi S, Ohira T, Kawazoe I, *et al.* Primary structure and characteristics of a lectin from skin mucus of the Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, **277**(30): 27305—27311
- [8] Ikhlas A, Karim E L, Gerard J, *et al.* Antimicrobial activity of neuropeptides against a range of microorganisms from skin, oral, respiratory and gastrointestinal tract sites [J]. *Journal of Neuroimmunology*, 2008, **200**(1—2): 11—16
- [9] Schally A V, Huang W Y, Redding T W, *et al.* Isolation, structural elucidation and synthesis of a tetradecapeptide with in vitro ACTH-releasing activity corresponding to residues 33—46 of the alpha-chain of porcine hemoglobin [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1978, **82**(2): 582—588
- [10] Brantl V, Gramsch C, Lottspeich F, *et al.* Novel opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins [J]. *European Journal of Pharmacology*, 1986, **125**(2): 309—310
- [11] Karelin A A, Philippova M M, Ivanov V T. Proteolytic degradation of hemoglobin in erythrocytes leads to biologically active peptides [J]. *Peptides*, 1995, **16**(4): 693—697
- [12] Hobson D, Hirsch J G. The antibacterial activity of hemoglobin [J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 1958, **107**(2): 167—183
- [13] Welch W D, Rose D M, Carlson R. Reduced hemoglobin as an inhibitor of human polymorphonuclear leukocyte bacterial killing. Role of hemoglobin oxygen tension in polymorphonuclear function [J]. *Surgery*, 1982, **91**(1): 75—80
- [14] Hand W L. Inhibition of cell-free oxidative bactericidal activity by erythrocytes and hemoglobin [J]. *Infection and Immunity*, 1984, **44**(2): 465—468
- [15] Olczak T, Simpson W, Liu X, *et al.* Iron and heme utilization in *Porphyromonas gingivalis* [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, **29**(1): 119—294
- [16] Parish C A, Jiang H, Tokiwa Y, *et al.* Broad-Spectrum antibacterial activity of hemoglobin [J]. *Bioorganic Medicine Chemistry*, 2001, **9**(2): 377—382
- [17] Liepke C, Baxmann S, Heine C, *et al.* Human hemoglobin-derived peptides exhibit antimicrobial activity: a class of host defense peptides [J]. *Journal of Chromatography B*, 2003, **791**(1—2): 345—356
- [18] Mak P, Wojcik K, Silberring J, *et al.* Antimicrobial peptides derived from heme-containing proteins: hemocidins [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2000, **77**(3): 197—207
- [19] Mak P, Wojcik K, Wicherek L, *et al.* Antibacterial hemoglobin peptides in human menstrual blood [J]. *Peptides*, 2004, **25**(11): 1839—1847
- [20] Zhou X E, Ouyang Y W, PAN X L, *et al.* Study on antimicrobial activity of human hemoglobin and its fragments both in vitro and in vivo [J]. *Journal of Sichuan University*, 2008, **39**(3): 355—359 [周新娥, 欧阳运薇, 潘小玲, 等. 人血红蛋白及其片段体内抗菌活性研究. *四川大学学报*, 2008, **39**(3): 355—359]
- [21] Deng L X, Pan X L, Wang Y, *et al.* Hemoglobin and its derived peptides may play a role in the antibacterial mechanism of the vagina [J]. *Human Reproduction*, 2009, **24**(1): 211—218
- [22] Wang L L. Identification and characterization of novel antimicrobial peptides from female productive Duc [D]. Thesis for Master of Science, Sichuan University, Chengdu. 2005 [王莉莉. 女性生殖道新抗菌肽的纯化及鉴定. 硕士学位论文, 四川大学, 成都. 2005]
- [23] Mak P, Siwek M, Pohl J, *et al.* Menstrual hemocidin HbB115—296 is an acidophilic antibacterial peptide potentiating the activity of human defensins, cathelicidin and lysozyme [J]. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2007, **57**(1): 81—91
- [24] Fogaca A C, da Silva P I Jr, Miranda M T, *et al.* Antimicrobial activity of bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus* [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, **274**(36): 25330—25334
- [25] Froidevaux R, Krier F, Nedjar-Arroume N, *et al.* Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment [J]. *FEBS Letters*, 2001, **491**(1—2): 159—163
- [26] Daoud R, Dubois V, Bors-Dodita L, *et al.* New antibacterial peptide derived from bovine hemoglobin [J]. *Peptides*, 2005, **26**(5): 713—719
- [27] Nedjar-Arroume N, Dubois-Delval V, Miloudi K, *et al.* Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin [J]. *Peptides*, 2006, **27**(9): 2082—2089
- [28] Nedjar-Arroume N, Dubois-Delval V, Miloudi K, *et al.* Bovine hemoglobin: An attractive source of antibacterial pep-

- tides [J]. *Peptides*, 2008, **29**(6): 969—977
- [29] Adje E Y, Balti R, Kouach M, *et al.* Obtaining antimicrobial peptides by controlled peptic hydrolysis of bovine hemoglobin [J]. *International Journal of Biological Macro Molecules*, 2011, **49**(2): 293—153
- [30] Catiou L, Traisnel J, Delval-Dubois V, *et al.* RYH: A minimal peptidic sequence obtained from beta-chain hemoglobin exhibiting an antimicrobial activity [J]. *Peptides*, 2011, **32**(7): 2963—2968
- [31] Catiou L, Traisnel J, Delval-Dubois V, *et al.* Minimal antimicrobial peptidic sequence from hemoglobin alpha-chain: KYR [J]. *Peptides*, 2011, **32**(4): 633—638
- [32] Patgaonkar M, Aranha C, Bhone G, *et al.* Identification and characterization of antimicrobial peptides from rabbit vaginal fluid [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2011, **139**(2—4): 176—186
- [33] Wang Y Z. Study on the abstraction and antibacterial activity of swine blood in vitro [D]. Thesis for Master of Science. Jilin Agricultural University of China, Changchun. 2010 [王延卓. 猪血中抗菌肽的提取及体外抗菌活性研究. 硕士论文, 吉林农业大学, 长春. 2010]
- [34] Zhang Y M, She R P, Liu T L, *et al.* Study on isolation, purification and antibacterial activities of antibacterial peptide in swine blood [J]. *Science Technology Review*, 2008, **26**(2): 33—37 [张艳梅, 余锐萍, 刘天龙, 等. 猪血中抗菌肽类物质的分离纯化和抗菌活性研究. 科技导报, 2008, **26**(2): 33—37]
- [35] Merchant M E, Roche C, Elsey R M, *et al.* Antibacterial properties of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2003, **136**(2—4): 505—513
- [36] Merchant M E, Thibodeaux D, Loubser K, *et al.* Amoebicidal effects of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*) [J]. *Journal of Parasitology*, 2004, **90**(6): 2980—2983
- [37] Merchant M E, Pallansch M, Paulman R L, *et al.* Antiviral activity of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*) [J]. *Antiviral Research*, 2005, **66**(1): 35—38
- [38] Hoffman, Binah B F, Ofer. Reptilian-derived peptides for the treatment of microbial infections [P]. US 6340667B1, 2002
- [39] Srihongthong S, Pakdeesuwan A, Daduang S, *et al.* Complete amino acid sequence of globin chains and biological activity of fragmented crocodile hemoglobin (*Crocodylus siamensis*) [J]. *The Protein Journal*, 2012, **31**(6): 466—476
- [40] Ullal A J, Wayne L R, Edward J, *et al.* Antimicrobial peptides derived from hemoglobin are expressed in epithelium of channel catfish (*Ictalurus punctatus*, *Rafinesque*) [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2008, **32**(11): 1301—1312
- [41] Fernandes J M O, Smith V J. Partial purification of antibacterial proteinaceous factors from erythrocytes of *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2004, **16**(1): 1—9
- [42] Zhang D L, Guan R Z, Huang W S, *et al.* Isolation and characterization of a novel antibacterial peptide derived from hemoglobin alpha in the liver of Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, DIO. 10.1016/j.fsi. 2012.08.022
- [43] Wang Q, Xiang R H, Bao Y B, *et al.* Research progress in animal hemoglobin [J]. *Journal of Ningbo University (NSEE)*, 2011, **24**(2): 20—24 [汪青, 项荣花, 包永波, 等. 动物血红蛋白研究进展. 宁波大学学报(理工版), 2011, **24**(2): 20—24]
- [44] Zhao J. Study on phenoloxidase-like properties and antibacterial activity of hemoglobin from blood clam *Scapharca kagoshimensis* [D]. Thesis for Doctor of Science. Ocean University of China, Qingdao. 2011 [荆昭. 毛蚶(*Scapharca kagoshimensis*)血红蛋白的类酚氧化酶性质及其抗菌活性研究, 博士论文, 中国海洋大学, 青岛. 2011]
- [45] Bao Y B, Wang Q, Lin Z H. Hemoglobin of the bloody clam *Tegillarca granosa* (Tg-HbI) is involved in the immune response against bacterial infection [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2011, **31**(4): 517—523
- [46] Nicolas P, Mor A. Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates [J]. *Annual Review of Microbiology*, 1995, **49**: 277—304
- [47] Corbier C, Krier F, Mulliert G, *et al.* Biological activities and structural properties of the atypical bacteriocins Mesenterocin 52B and Leucocin B-TA33a [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(4): 1418—1422
- [48] 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]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996, **45**(6): 778—784
- [49] Ivanov V T, Karelin A A, Philippova M M, *et al.* Hemoglobin as a source of endogenous bioactive peptides: the concept of tissue-specific peptide pool [J]. *Biopolymers*, 1997, **43**(2): 171—188
- [50] Ivanov V T, Karelin A A, Blischenko E Y, *et al.* Proteolytic degradation of hemoglobin *in vivo*. Role in formation of tissue specific peptide pool [J]. *Pure and Applied Chemistry*, 1998, **70**(1): 67—74
- [51] Ivanov V T, Yatskin O N, Kalinina O A, *et al.* Tissue-specific peptide pools. Generation and function [J]. *Pure and Applied Chemistry*, 2000, **72**(3): 355—363