

## 鱼类溶菌酶和组织蛋白酶研究进展\*

# Advance on Lysozyme and Cathepsin of Fish

魏世娜, 秦启伟\*\*

WEI Shina, QIN Qiwei

(华南农业大学海洋学院, 广东广州 510642)

(College of Marine Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong, 510642, China)

**摘要:**溶菌酶和组织蛋白酶在鱼类先天性免疫系统中发挥重要作用。溶菌酶是一种具有生物活性的、能水解粘多糖的无毒、无公害小分子碱性酶,参与机体多种免疫反应,在抵抗外来病原细菌、真菌、病毒或肿瘤入侵中起重要作用。组织蛋白酶是半胱氨酸蛋白酶家族的主要成员,参与机体的多种生理和病理活动,目前在细胞凋亡中的作用日益受到重视。本综述主要介绍近年来鱼类溶菌酶和组织蛋白酶在生物学功能、基因克隆、组织分布及重组蛋白功能活性的新研究进展。

**关键词:**鱼类 溶菌酶 组织蛋白酶 生物学特性 基因与蛋白

**中图分类号:**S942.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2018)01-0032-04

**Abstract:** Lysozyme and cathepsin play an important role in fish innate immune system. Lysozyme is a biologically active non-toxic, non-polluting small molecule alkaline enzyme that can hydrolyze mucopolysaccharide. It participates in a variety of immune responses in the body and plays an important role in resisting the pathogen such as bacteria, fungi, viruses or tumor invasion. Cathepsin is the main member of the cysteine protease family and it has the key function in the different kinds of physiological and pathological activities. At present, the role of cathepsin in apoptosis is gaining more and more attention. This review mainly introduces the new research progress of fish lysozyme and cathepsin in biological function, gene cloning, tissue distribution and functional activity of recombinant protein in recent years.

**Key words:** fish, lysozyme, cathepsin, biology property, gene and protein

## 0 引言

近年来,我国鱼类养殖业取得了迅猛的发展,然而,随着集约化养殖程度的不断提高及养殖环境的不断恶化,病害频发严重影响了我国鱼类养殖业的可持续发展。目前,我国养殖鱼类出现的疾病种类很多,主要分为病毒、真菌、细菌、寄生虫等4种。这些疾病

虽然可以通过药物治疗,但由于药物的频繁使用,鱼体产生了抗药性,而大剂量的用药又导致水体生态失衡,也对鱼类有很大的毒副作用,甚至因为药物的刺激使患病鱼类死亡。因此除了改善养殖环境等物理因素外,提高鱼类自身免疫力将是防控鱼类疾病的重要发展方向。鱼类免疫系统包括先天性或非特异性免疫,以及获得性或特异性免疫。特异性免疫主要是产生特异性抗体作用于抗原,但免疫机制还不完善,主要由于鱼类抗体种类较少,形成时间较长及抗体滴度升高比较缓慢等因素。因此,非特异性免疫作为机体的第一道防线,在鱼类维持机体健康、抵御病原入侵中起了重要的作用。

溶菌酶和组织蛋白酶都是蛋白水解酶,是鱼类防御病原微生物入侵的重要非特异性免疫因子,在鱼病防治中发挥主要作用,具有良好的开发应用前景,但

收稿日期:2017-12-06

修回日期:2018-01-08

作者简介:魏世娜(1985—),女,副教授,主要从事鱼类免疫学研究。

\* 广东省自然科学基金项目(2014A030310387)资助。

\*\* 通信作者:秦启伟(1964—),男,教授,博士生导师,主要从事鱼类分子病毒学和海水高效健康养殖研究, E-mail: qinqw@scsio-ac.cn。

作用机理完全不同。目前国内外专家对鱼类溶菌酶和组织蛋白酶的研究已较为深入,本文通过对溶菌酶和组织蛋白酶生物学功能、基因克隆、组织分布及重组蛋白功能活性等进行阐述,以期能为鱼类病害防治提供理论依据,并为抗病饲料的开发提供技术支持。

## 1 鱼类溶菌酶和组织蛋白酶的作用机理

### 1.1 鱼类溶菌酶的作用机理

鱼类溶菌酶是存在于许多鱼类的体表粘液、肠道粘液、血清和巨噬细胞中的一种水解酶。主要通过水解细胞壁肽聚糖中的 N-乙酰胞壁酸和 N-乙酰葡萄糖胺之间的  $\beta$ -1,4 糖苷键,使细胞壁不溶性粘多糖分解成可溶性糖肽,在内部渗透压的作用下导致细胞壁破裂,引起细菌裂解,而释放的肽聚糖碎片是合成与分泌各种抗菌蛋白的诱导物,也能诱导溶菌酶的产生。溶菌酶的活性中心主要由 Glu35 和 Asp52 组成,在机体抗病免疫过程的主要功能为水解细菌细胞壁而导致细菌破裂死亡<sup>[1-2]</sup>,改善和增强巨噬细胞吞噬能力和消化功能,诱导调节其他免疫因子的合成与分泌,从而抵御外来微生物的入侵<sup>[3-4]</sup>。此外还能通过非酶机制诱导微生物产生自溶酶而杀菌,但此机理有待进一步研究。除了具有抗菌功能,溶菌酶还具有抗病毒的功能,主要通过带负电荷的病毒蛋白直接作用,从而与 DNA、RNA 和脱辅基蛋白形成复合物使病毒失活。

### 1.2 鱼类组织蛋白酶的作用机理

组织蛋白酶是一类溶酶体半胱氨酸蛋白酶,主要存在于动物组织的细胞内,特别是溶酶体内,参与蛋白质的降解,在各种生理和病理过程发挥重要作用,但其活性受到合成酶原的活化、内源性抑制剂和 pH 值等多方面的调节<sup>[5-6]</sup>。在病理情况下主要参与线粒体介导的细胞凋亡。如组织蛋白酶 B 是一种溶酶体内巯基蛋白酶,释放到胞浆或组织间隙并被激活,介导细胞炎症性坏死及发生凋亡<sup>[7]</sup>。还可通过直接或间接激活 caspase 的机制引发细胞凋亡<sup>[8-9]</sup>。组织蛋白酶 C 除了能在溶酶体内从蛋白质底物的氨基酸末端除去二肽,还可作为体内多种功能性蛋白酶的激活酶,在免疫和炎症细胞中参与调控许多丝氨酸蛋白酶的活性。

## 2 鱼类溶菌酶和组织蛋白酶的分子生物学

根据不同的物种来源,溶菌酶主要分为 6 类,鸡蛋清溶菌酶 C 型、鹅蛋清溶菌酶 G 型、无脊椎动物 I 型、植物型、微生物型和噬菌体型。鱼类溶菌酶主要分为 C 型溶菌酶和 G 型溶菌酶两种类型。组织蛋白

广西科学 2018 年 2 月 第 25 卷第 1 期

酶根据不同的催化中心分为不同的类型,主要分为组织蛋白酶 A~Z,而在鱼类中组织蛋白酶 B 和 L 研究较多,这些酶与鱼体中许多生理和病理活动密切相关。

### 2.1 鱼类 C 型和 G 型溶菌酶及组织蛋白酶的基因克隆

#### 2.1.1 鱼类 C 型和 G 型溶菌酶的基因克隆

目前国内外关于鱼类 C 型和 G 型溶菌酶基因克隆的研究报道较多,但鱼类 C 型溶菌酶与 G 型溶菌酶仅有 10% 的同源性。

##### (1) C 型溶菌酶

Dautigny 等<sup>[10]</sup>分别从虹鳟的肝脏和肾脏 cDNA 文库中获得两种类型的 C 型溶菌酶基因片段,主要第 86 位氨基酸不同,分别为天冬氨酸残基和丙氨酸残基。Mitra 等<sup>[11]</sup>进一步发现这两种溶菌酶基因组相似,都具有 4 个外显子和 3 个内含子,但在抗菌功能方面存在差异,仅有一种溶菌酶具有抗菌活性。Hikima 等<sup>[12]</sup>从日本牙鲆的肾脏 cDNA 文库也获得了 C 型溶菌酶基因片段,其氨基酸序列与虹鳟、鸡和人的序列比对发现,酶活性位点及半胱氨酸残基完全保守,且与虹鳟的同源性为 72.9%,与鸡和人的同源性分别为 57.4% 和 65.4%。Wei 等<sup>[13]</sup>从石斑鱼脾组织中克隆获得 C 型溶菌酶,其全基因组包含 4 个外显子和 3 个内含子,具有保守的催化位点和 8 个保守的半胱氨酸残基;Blast 比对发现该基因序列与褐石斑鱼具有 94% 的同源性。

##### (2) G 型溶菌酶

Hikima 等<sup>[14]</sup>从日本牙鲆的 DNA 文库中首次克隆了 G 型溶菌酶基因,该基因编码 195 个氨基酸,其基因组包含 5 个外显子和 4 个内含子。Yin 等<sup>[15]</sup>从斜带石斑鱼的血细胞 cDNA 文库中也克隆了 G 型溶菌酶全序列,它编码 194 个氨基酸,该序列与日本牙鲆、鲤鱼、鸟类和哺乳类的 G 型溶菌酶序列同源性较高,且具有保守的酶活性位点,但缺乏鸟类和哺乳类 G 型溶菌酶的半胱氨酸残基,与日本牙鲆 G 型溶菌酶的同源性为 72.2%。Wei 等<sup>[16]</sup>从石斑鱼脾组织中克隆获得 G 型溶菌酶,新的 G 型溶菌酶全基因组包含 4 个外显子和 3 个内含子,氨基酸比对发现其具有保守的催化位点和底物结合位点;Blast 比对发现该基因序列与半滑舌鳎具有 62% 的同源性。

#### 2.1.2 鱼类组织蛋白酶的基因克隆

Whang 等<sup>[17]</sup>对条石鲷组织蛋白酶 B 和 L 进行克隆,氨基酸同源性分析表明组织蛋白酶 B 序列与紫红笛鲷的同源性为 90%,而组织蛋白酶 L 序列与尖吻鲈的同源性为 95%,并且具有相同的进化关系。

Wei 等<sup>[18]</sup>从石斑鱼脾组织中获得了石斑鱼组织蛋白酶 B 的 cDNA 序列,该序列编码 330 个氨基酸,氨基酸比对发现与人类组织蛋白酶 B 相似,具有典型的结构特征,包括前肽区和半胱氨酸蛋白酶结构域,后者包含了 4 个高度保守的催化位点和 3 个活性位点,进化分析显示其与紫红笛鲷和条石鲷相似度最高。

## 2.2 鱼类溶菌酶和组织蛋白酶基因在体内的表达模式

鱼类溶菌酶基因在机体各组织内广泛分布表达,经不同外源刺激(如细菌或病毒感染)一定时间后,在免疫组织如头肾、肾和脾脏中的表达量明显提高。Hikima 等<sup>[12,14]</sup>研究结果表明,在健康的日本牙鲆中,C 型溶菌酶在头肾、后肾、脾脏、脑和卵巢等组织中有明显转录;经爱德华氏菌感染后,在头肾、脾脏和卵巢中的表达量显著增加。日本牙鲆的 G 型溶菌酶在体内多种组织也均有表达,经爱德华氏菌感染后,G 型溶菌酶在心脏、肠道和血液中的表达量显著增加。经脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)、溶藻弧菌和新加坡石斑鱼虹彩病毒(Singapore grouper iridovirus, SGIV)刺激石斑鱼后,C 型和 G 型溶菌酶在头肾组织中的表达量均具有不同程度的升高,说明溶菌酶在细菌和病毒的感染中发挥了相对重要的作用<sup>[13,16]</sup>。

Whang 等<sup>[17]</sup>分析了条石鲷组织蛋白酶 B 和 L 在不同组织的表达,经脂多糖和细菌感染后,检测其肝脏和血细胞的时间表达差异。组织蛋白酶 B 在石斑鱼各个组织中均有分布,经 SGIV 刺激后,其在头肾中的表达量在 24 h 有明显上调<sup>[18]</sup>。

## 2.3 鱼类溶菌酶和组织蛋白酶的蛋白功能

### 2.3.1 鱼类溶菌酶的蛋白功能

鱼类 C 型溶菌酶和 G 型溶菌酶均能通过原核表达系统或真核表达系统来表达重组蛋白,且表达产物的抗菌谱相似,不仅对革兰氏阳性菌有抑菌作用,还对革兰氏阴性菌具有溶菌功能。Minagawa 等<sup>[19]</sup>利用杆状病毒表达系统在昆虫细胞中表达日本牙鲆 C 型溶菌酶,该重组蛋白对鳗弧菌和溶壁微球菌有明显的抑菌作用,但对爱德华氏菌和链球菌的活力较差。石斑鱼 C 型和 G 型溶菌酶对溶壁微球菌、溶藻弧菌、金黄色葡萄球菌和海豚链球菌都有一定的抑制性,但作用效果有差异。体外过表达 C 型溶菌酶和 G 型溶菌酶均能抑制 SGIV 感染的细胞病变,从而降低了病毒主要衣壳蛋白 MCP 的表达,但 C 型溶菌酶的抗病毒效果较明显<sup>[13,16]</sup>。

### 2.3.2 鱼类组织蛋白酶的蛋白功能

目前国内外对于鱼类组织蛋白酶研究仅限于克

隆、原核表达及在不同组织的差异表达,而对于有生物学活性的组织蛋白酶功能方面研究比较少。Guicciardi 等<sup>[20-21]</sup>发现组织蛋白酶 B 是在肝细胞凋亡通路当中占有重要作用的蛋白酶之一,Wei 等<sup>[18]</sup>发现石斑鱼组织蛋白酶 B 参与了 SGIV 感染诱导的细胞凋亡。总的来说,组织蛋白酶的主要功能是参与机体的免疫调节作用、蛋白质的降解和酶原的活化。因此研究不同类型的组织蛋白酶对于鱼体防御功能的相关研究成为目前研究关注的热点。

## 3 鱼类溶菌酶和组织蛋白酶的应用前景

鱼类重组溶菌酶抗菌谱与已报道的鸡蛋清溶菌酶等有所不同,对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都具有溶菌功能,包括对枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌和藤黄八叠球菌等有强烈的抗菌作用,除了具有广谱的抗菌功能,还能抑制病毒的感染,因此,重组鱼类溶菌酶可作为饲料添加剂应用于水生动物病害防治,从而减少药物残留及解决细菌耐药性等问题,将是实现水产健康养殖的途径之一。组织蛋白酶除了可在溶酶体内非选择性地降解蛋白质,还具有“清道夫”的作用,而且与 MHC class II 依赖性的抗原呈递、肿瘤侵袭、食物消化等等有关。总之,研究鱼类溶菌酶和组织蛋白酶,对于了解鱼类的先天性免疫机制及控制相关疾病的发生具有重要的意义。

### 参考文献:

- [1] MORI K, NAKANISHI T, SUZUKI T, et al. Defense mechanisms in invertebrates and fish[J]. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 1989, 34(3): 214-223.
- [2] BOMAN H G, FAYE I, GUDMUNDSSON G H, et al. Cell-free immunity in cecropia. A model system for antibacterial proteins[J]. Eur J Biochem, 1991, 201(1): 23-31.
- [3] MORISHIMA I, YAMADA K, UENO T. Bacterial peptidoglycan as elicitor of antibacterial protein synthesis in larvae of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1992, 22(4): 363-367.
- [4] FUJIMOTO S, TOSHIMORI-TSUDA I, KISHIMOTO K, et al. Protein purification, cDNA cloning and gene expression of lysozyme from eri-silkworm, *Samia cynthia ricini* [J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2001, 128(4): 709-718.
- [5] TURK B, TURK D, TURK V. Lysosomal cysteine proteases: More than scavengers[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1477: 98-111.
- [6] TURK V, TURK B, GUNCAR G, et al. Lysosomal cathepsins: Structure, role in antigen processing and presentation, and cancer[J]. Adv Enzyme Regul, 2002, 42: 285-303.
- [7] SALVESEN G S. A lysosomal protease enters the death

- scene[J]. J Clin Invest, 2001, 107(1): 21-22.
- [8] STOKA V, TURK B, SCHENDEL S L, et al. Lysosomal protease pathways to apoptosis: Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276: 3149-3157.
- [9] CIRMAN T, ORESIC K, MAZOVEC G D, et al. Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins [J]. J Biol Chem, 2004, 279(5): 3578-3587.
- [10] DAUTIGNY A, PRAGER E M, PHAM-DINH D, et al. CDNA and amino acid sequences of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) lysozymes and their implications for the evolution of lysozyme and lactalbumin[J]. J Mol Evol, 1991, 32(2): 187-198.
- [11] MITRA A, FOSTER-FREY J, REXROAD C E, et al. Molecular characterization of lysozyme type II gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Evidence of gene duplication[J]. Anim Biotechnol, 2003, 14(1): 7-12.
- [12] HIKIMA J, HIRONO I, AOKI T S. Characterization and expression of c-type lysozyme cDNA from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1997, 6(4): 339-344.
- [13] WEI S N, HUANG Y H, CAI J, et al. Molecular cloning and characterization of c-type lysozyme gene in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2012, 33(2): 186-196.
- [14] HIKIMA J, MINAGAWA S, HIRONO I, et al. Molecular cloning, expression and evolution of the Japanese flounder goose-type lysozyme gene, and the lytic activity of its recombinant protein [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2001, 1520(1): 35-44.
- [15] YIN Z X, HE J G, DENG W X, et al. Molecular cloning, expression of orange-spotted grouper goose-type lysozyme cDNA, and lytic activity of its recombinant protein [J]. Dis Aquat Organ, 2003, 55(2): 117-123.
- [16] WEI S N, HUANG Y H, HUANG X H, et al. Molecular cloning and characterization of a new G-type lysozyme gene (Ec-lysG) in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* [J]. Dev Comp Immunol, 2014, 46(2): 401-412.
- [17] WHANG I, DE ZOYSA M, NIKAPITIYA C, et al. Molecular characterization and expression analysis of cathepsin B and L cysteine proteases from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2011, 30(3): 763-772.
- [18] WEI S N, HUANG Y H, HUANG X H, et al. Characterization of cathepsin B gene from orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* involved in SGIV infection [J]. Fish Shellfish Immunol, 2014, 36(1): 194-205.
- [19] MINAGAWA S, HIKIMA J, HIRONO I, et al. Expression of Japanese flounder c-type lysozyme cDNA in insect cells [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2001, 25: 439-445.
- [20] GUICCIARDI M E, DEUSSING J, MIYOSHI H, et al. Cathepsin B contributes to TNF- $\alpha$ -mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome C [J]. Journal of Clinical Investigation, 2000, 106(9): 1127-1137.
- [21] GUICCIARDI M E, MIYOSHI H, BRONK S F, et al. Cathepsin B knockout mice are resistant to tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated hepatocyte apoptosis and liver injury [J]. The American Journal of Pathology, 2001, 159(6): 2045-2054.

(责任编辑: 陆雁)

(上接第 31 页 Continue from page 31)

- [23] LI P F, WEI S N, ZHOU L L, et al. Selection and characterization of novel DNA aptamers specifically recognized by Singapore grouper iridovirus-infected fish cells [J]. Journal of General Virology, 2015, 96(11): 3348-3359.
- [24] DUAN N, WU S J, CHEN X J, et al. Selection and identification of a DNA aptamer targeted to *Vibrio parahemolyticus* [J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(16): 4034-4038.
- [25] DUAN N, YAN Y L, WU S J, et al. *Vibrio parahae - molyticus* detection aptasensor using surface-enhanced Raman scattering [J]. Food Control, 2016, 63: 122-127.
- [26] LI P F, ZHOU L L, WEI J G, et al. Development and characterization of aptamer-based enzyme-linked aptasorbent assay for the detection of Singapore grouper iridovirus infection [J]. J Appl Microbiol, 2016, 121(3): 634-643.
- [27] ZHOU L, LI P, NI S, et al. Rapid and sensitive detection of redspotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) infection by aptamer-coat protein-aptamer sandwich enzyme-linked apta-sorbent assay (ELASA) [J]. Journal of Fish Diseases, 2017, 40(12): 1831-1838.
- [28] DUAN N, WU S J, YU Y, et al. A dual-color flow cytometry protocol for the simultaneous detection of *Vibrio parahemolyticus* and *Salmonella typhimurium* using aptamer conjugated quantum dots as labels [J]. Anal Chim Acta, 2013, 804: 151-158.
- [29] BUNKA D H J, STOCKLEY P G. Aptamers come of age- At last [J]. Nature Reviews Microbiology, 2006, 4(8): 588-596.
- [30] CHU T C, TWU K Y, ELLINGTON A D, et al. Aptamer mediated siRNA delivery [J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(10): e73.
- [31] BAGALKOT V, ZHANG L F, LEVY-NISSENBAUM E, et al. Quantum dot-aptamer conjugates for synchronous cancer imaging, therapy, and sensing of drug delivery based on bi-fluorescence resonance energy transfer [J]. Nano Letters, 2007, 7(10): 3065-3070.

(责任编辑: 陆雁)