

两栖类动物皮肤分泌物及其生物学适应意义 ——大蹼铃蟾皮肤分泌物蛋白质多肽组的启示

张 云*

(中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223)

摘要：以大蹼铃蟾 (*Bombina maxima*) 为代表性物种, 揭示了两栖类皮肤分泌物蛋白质多肽组丰富的分子和功能多样性。目前在大蹼铃蟾已发现的分子包括 3 类不同的抗菌肽、缓激肽、缓激肽增强肽和缓激肽拮抗肽、缓激肽基因相关肽、富含脯氨酸铃蟾肽及其基因相关肽、神经调节素 U、Bv8 肽、三叶型蛋白和蛋白酶抑制剂等。抗菌肽分子多样性及其形成机制、缓激肽及其基因相关肽功能和表达模式的多样性都较好地揭示了在多样的生态条件下, 两栖类皮肤活性肽环境适应的分子基础及生物合成的调控机制。富含血红素辅基的白蛋白广泛分布在大蹼铃蟾皮肤外层细胞膜上和真皮海绵层内, 表明它在皮肤的生理功能, 如在呼吸、物质交换和渗透压调节中有重要作用。两栖类皮肤分泌物蛋白质多肽组, 由于其分子结构的多样性、新颖性和哺乳类同系物的存在, 在生物医学研究和天然药物开发中具有独特和不可替代的价值; 同时, 两栖类皮肤功能基因组具有多样性丰富、快速重组突变的特征, 是探讨生物适应的基因基础、基因形成机制和进化特性等生物学基本问题的优秀模型。

关键词：两栖类; 大蹼铃蟾; 皮肤; 蛋白质组; 生物适应; 抗菌肽; 神经肽; 白蛋白

中图分类号：Q959.56; Q51 **文献标识码：**A **文章编号：**0254–5853 (2006) 01–0101–012

Amphibian Skin Secretions and Bio-adaptive Significance —Implications from *Bombina maxima* Skin Secretion Proteome

ZHANG Yun*

(Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650223, China)

Abstract: The studies on *Bombina maxima* revealed the rich molecular and functional diversity of amphibian skin secretion proteins and peptides. Discovered peptides from *B. maxima* skin secretions are three classes of antimicrobial peptides, bradykinin analogs and its gene associated peptides with diverse biological functions, proline-rich bombesin and its gene associated peptides, neuromedin U analog, Bv8 peptides, trefoil factors and protease inhibitors. The molecular and functional diversity, gene formation mechanisms and expression patterns of the peptides in *B. maxima* skin well reflect the molecular basis of bio-adaptation of the frog in certain living environments. In addition, *B. maxima* albumin with a heme b cofactor is widely distributed around the membranes of epithelial layer cells and within the stratum spongiosum of dermis in the skin, indicating its important roles in skin physiological functions, like water economy, metabolite exchange and osmoregulation, etc. The extraordinary complexity of peptides found in amphibian skin, coupled with the high probability of their novel molecular structures and possible counterparts in mammals, make amphibians an important target group in biomedical research and new drug development. Meanwhile, amphibian skin functional genome should be a nice model to study molecular biology of bio-adaptation, new gene formation and evolution.

Key words: Amphibians; *Bombina maxima*; Skin; Proteome; Bio-adaptation; Antimicrobial peptides; Neuro-peptides; Albumin

两栖类动物是原始、初登陆的四足动物, 也是 从水生鱼类演化到真正陆地生的爬行类动物之间的

* 收稿日期: 2005–09–16; 接受日期: 2005–12–13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170195, 30200044, 30570359, 30470380)

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: zhangy@mail.kiz.ac.cn

过渡类群。世界现有两栖动物 5504 种, 隶属 3 目 44 科 446 属 (Frost, 2002)。中国现有两栖动物 325 种, 隶属 3 目 11 科 59 属 (Fei et al, 2005), 其中云南、四川、贵州和西藏分别为 120、108、68 和 47 种, 共占 72% (233 种), 在中国占有相当重要的地位。这与云南、四川、贵州和西藏等四省的自然环境、地理和气候条件复杂有关。两栖类皮肤对维持两栖动物自身生存和适应栖息地的多样化生态环境起着重要作用, 能为其生存提供必须的功能: 呼吸作用、调节水分、抵御捕食、抗微生物入侵、排泄、生殖等 (Duellman & Trueb, 1986)。两栖类皮肤含有丰富的腺体 (主要包括分泌腺和粘液腺), 其腺体分泌物是两栖类动物生物化学物质的一个主要来源 (Clarke, 1997; Lai et al, 2002a)。

(1) 两栖类皮肤是生物活性蛋白质多肽的较好来源: 蛋白质多肽在两栖类皮肤中大量表达, 其含量远远超过了来源于哺乳动物各种组织类似物的含量。而两栖类皮肤是一种非常容易获得的资源, 更适合于这些蛋白质多肽的发现、纯化和功能研究。

(2) 不同物种的皮肤中贮藏着不同种类的生物活性分子, 因此, 多肽目录呈现出超乎想像的分子和功能多样性。

(3) 两栖类皮肤中的每种活性蛋白质多肽在哺乳类中都具有类似物, 这个预测得到许多实验证据 (Erspamer, 1971; Bevins & Zasloff, 1990; Daly, 1995) 的支持。本文以大蹼铃蟾 (*Bombina maxima*) 作为代表性物种进行有关两栖类皮肤分泌物分子和

功能多样性及其生物适应意义的综述, 拟唤起人们对两栖类皮肤分泌物蛋白质多肽组, 特别是中国产特色物种的特殊分子多样性, 及其在生物学、生物医学基础研究以及天然药物开发中的意义的关注。

大蹼铃蟾 (*B. maxima*) 隶属铃蟾科 (Bombinatoridae) 铃蟾属 (*Bombina*), 分布于中国四川 (西南部高山区)、云南 (中部及西北部地区)、贵州省。大蹼铃蟾常栖于高山区农田和林地附近, 生存在相对恶劣的环境里, 如具有大量细菌、微生物的静池塘 (图 1), 而且当地的居民都知道它很“毒”。在对 6 种两栖类皮肤分泌物作小鼠致死活性、抗菌、溶血和细胞毒试验的生物学活性初步检测中, 发现大蹼铃蟾的皮肤分泌物具有很强的生物学活性 (Lai et al, 2002b, c), 小白鼠腹腔注射的半数致死剂量达 18.8 mg/kg, 其“生物毒性”与蝮科蛇毒相当。通过生物化学与分子生物学手段, 获得了若干类活性蛋白质多肽。

1 抗菌肽

从植物、无脊椎动物、脊椎动物和人体中已经成功地分离并获得抗菌肽 (Zasloff, 2002)。在两栖类动物中, 抗菌肽由位于皮肤外层的真皮腺体分泌产生, 为个体本身提供了一个迅速的防御体系, 以抵抗有害微生物的入侵 (Barra & Simmaco, 1995), 是两栖类天然免疫系统的重要组成部分。

研究表明, 大蹼铃蟾皮肤分泌物有三类不同的



图 1 池塘中的大蹼铃蟾

Fig. 1 *Bombina maxima*

抗菌肽，即 maximin、maximin H 和 maximin S，是大蹼铃蟾皮肤分泌物的主要活性分子类群。Maximin 和 maximin H 分别对应于从铃蟾属东方铃蟾 (*Bombina orientalis*) 和多彩铃蟾 (*B. variegata*) 中发现的 bombinin 和 bombinin H 抗菌肽 (Gibson et al, 1991; Simmaco et al, 1991); maximin S 是从大蹼铃蟾中新发现的一组抗菌肽分子。

1.1 Maximin 及 maximin H 抗菌肽

1.1.1 结构及分子多样性 通过生物化学手段，由大蹼铃蟾皮肤分泌物中纯化得到抗菌肽 maximin

1~5，由 27 个氨基酸组成；而 maximin H 1~4，则由 20 个氨基酸组成 (Lai et al, 2002d)。为了解这些抗菌肽的分子多样性，构建了来自大蹼铃蟾的两个独立个体皮肤的 cDNA 文库，得到 56 个独立的 cDNA 序列。它们编码的蛋白质前体包含信号肽、两个酸性前肽、间隔肽以及抗菌肽 maximin 及 maximin H。这些 cDNA 序列一共编码 11 种不同的成熟 maximin 抗菌肽 (maximin 1~11) 以及 16 种 maximin H 抗菌肽 (maximin H 1~16) (表 1)。在对来自于 20 只大蹼铃蟾收集的皮肤分泌物中的抗

表 1 大蹼铃蟾皮肤抗菌肽 (引自 Lee et al, 2005a; Wang et al, 2005)
Tab. 1 Antimicrobial peptides identified in *Bombina maxima* skin (cited from Lee et al, 2005a; Wang et al, 2005)

Mature peptides	Structures
maximin	
maximin 1	GIGTKILGGVKTALKGALKELASTYAN-NH ₂
maximin 2	GIGTKILGGVKTALKGALKELASTYVN-NH ₂
maximin 3	GIGGKILSGLKTALKGAAKELASTYLH
maxinin 4	GIGGVLLSAGKAALKGLAKVLAEKYAN-NH ₂
maximin 5	SIGAKILGGVKTFFKGALKELASTYLQ
maximin 6	GIGGALLSAGKSALKGLAKGLAEHFAN-NH ₂
maximin 7	GIGAKILGGVKTALKGALKELASTYVN-NH ₂
maximin 8	GIGTKILGGLKTAVKGALKELASTYVN-NH ₂
maximin 9	GIGRKFLGGVKTTFRCGVKDFASKHLY-NH ₂
maximin 10	GIGGALLSAGKSALKGLAKGLAEHFAS-NH ₂
maximin 11	GIGTKIIGGLKTAVKGALKELASTYVN-NH ₂
maximin H	
maximin H1	ILGPVISTIGGVLGGLLKNL-NH ₂
maximin H2	ILGPVLSMVGSA LGGLIKKI-NH ₂
maximin H3	ILGPVLGLVGNALGGLIKKI-NH ₂
maximin H4	ILGPVISKIGGVLGGLLKNL-NH ₂
maximin H5	ILGPVLGLVSDTLDDVLGIL-NH ₂
maximin H6	ILGPVIGTIGNVLGGLLKNL-NH ₂
maximin H7	ILGPVIKTIGGVIGGLLKNL-NH ₂
maximin H8	ILGPVLGLVSNALGGLLKNI-NH ₂
maximin H9	ILGPVLGLVSNALGGLIKKI-NH ₂
maximin H10	ILGPVLGLVSNALGGLLKNL-NH ₂
maximin H11	ILGPVLGLVGSALGGLIKKI-NH ₂
maximin H12	LLGPVLGLVSNALGGLLKNI-NH ₂
maximin H13	ILGPVIKTIGGVLGGLLKNL-NH ₂
maximin H14	ILGPVLGLVGEPLGGLIKKI-NH ₂
maximin H15	ILGPVLGLVGNALGGLLKNL-NH ₂
maximin H16	ILGPVLSLVGNALGGLIKKI-NH ₂
maximin S	
maximin S1	GSNTGFNFKTLDKE
maximin S2	GSNKGFMVDMIQALSN-NH ₂
maximin S3	GSNKGFMVDMINALSN-NH ₂
maximin S4	RSNKGFMVDMIQALSK-NH ₂
maximin S5	GSNKGFMVDMIQALSK-NH ₂

菌肽进行 MALDI-TOF 质谱分析时, maximin 1 ~ 8、10 ~ 11 和 maximin H1 ~ 10、12 都得到很好的相对应的分子量的确认, 表明这些多肽在皮肤中的有效表达 (Lee et al, 2005a)。

在发现的 maximin 及 maximin H 抗菌肽中, 有两个分子值得特别关注, 其一是含自由巯基的抗菌肽 maximin 9, 该抗菌肽是首次在真核生物中发现含有自由巯基的抗菌肽 (Lee et al, 2005b), 其特征是位于分子中部在其他 maximin 中高度保守的 Gly16 突变为 Cys16; 其二是 maximin H5, 该抗菌肽是自然界中发现的第一个基因编码的酸性抗菌肽 (Lai et al, 2002e), 组成其分子的 20 个氨基酸残基中含有 3 个酸性天冬氨酸残基, 而不含碱性氨基酸残基。

1.1.2 生物学活性及环境适应意义 Maximin 及 maximin H 抗菌肽对革兰氏阳性菌及革兰氏阴性菌, 如大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、巨大芽胞杆菌、绿脓杆菌和痢疾杆菌均有较强的抗菌活性, 其最小抑菌浓度介于 1 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。同时, 由于结构变异, 它们又表现出抗菌活性的差异及对细菌菌株的选择性 (Lai et al, 2002d)。就抗真菌活性而言, 这些抗菌肽的活力较低, 仅对白色念球菌表现出抗菌活性, 而对所测试的青霉、黄曲霉生长无抑制作用。实验证明 maximin 9 基本不具有抗细菌活性, 而具有显著的抗支原体活性, 而且其活性依赖于分子中游离的半胱氨酸 (Lee et al, 2005b)。支原体是从革兰氏阳性菌中分化出来的简单细菌, 其特点在于无细胞壁, 因而与典型细菌不同, 其细胞膜上含有胆固醇以起到稳定细胞膜的作用。推测 maximin 9 的自由巯基可促进抗菌肽与支原体的结合而起到抑制支原体的作用。

比较而言, 首次发现的酸性抗菌肽 maximin H5 的抗菌谱较窄, 在所测试的微生物中, 仅发现金黄色葡萄球菌对其敏感, 且活性也较低 (最小抑菌浓度 80 $\mu\text{mol}/\text{L}$) (Lai et al, 2002e)。这里需要特别强调的是, 实验用于测定抗菌肽活性的微生物基本来源于临床医院, 与大蹼铃蟾生活生态环境的微生物谱系有所不同, 因此, 由于所测定的微生物与特定抗菌肽的天然靶向微生物的差异, 其敏感度低是可以理解的。抗菌蛋白质和多肽的一个共同特点都是带正电荷的碱性分子, 以利于攻击细菌带负电荷的细胞膜。然而, 目前的研究发现, 细菌 (如金黄色葡萄球菌) 发展了多种抵抗碱性抗菌肽的手段,

其中包括自我修饰细胞膜以降低膜负电荷, 耗能排出抗菌肽, 改变膜流动性及水解抗菌肽等。Maximin H5 的存在表明, 为了适应特定的生活环境, 和碱性抗菌肽一起, 酸性抗菌肽也存在于两栖类动物的初级免疫系统中, 这是生物适应 - 共同进化的良好佐证。

比较不同实验室对铃蟾属物种大蹼铃蟾 (*B. maxima*)、东方铃蟾 (*B. orientalis*) 和多彩铃蟾 (*B. variegata*) 类似抗菌肽家族的研究结果发现, 采自中国云南楚雄山区成体的大蹼铃蟾, 其抗菌肽的分子多样性显著大于东方铃蟾和多彩铃蟾, 从后两个物种的皮肤中仅分别鉴定出 4 和 7 个 bombinin 肽 (maximin 类似), 以及 4 和 5 个 bombinin H 抗菌肽 (maximin H 类似), 且相互之间变异度很小 (Gibson et al, 1991; Simmaco et al, 1991)。造成这种分子多样性和复杂性的显著差异的因素, 最合理的解释就是生态环境的驱动: 动物行为生态学观测表明, 大蹼铃蟾蝌蚪生存在相对清澈的水中, 而成体却喜好生存在具有大量细菌、微生物等非常恶劣的池塘泥土环境里; 分离鉴定东方铃蟾和多彩铃蟾抗菌肽的个体均来源于动物园和实验室长期饲养的环境。

1.1.3 其他生物学活性 除了抗菌活性外, maximin 抗菌肽在微摩尔浓度下对培养的肿瘤细胞显示细胞毒性 (IC_{50} 15 ~ 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Sheng et al, 2002, 2003)。有趣的是, 在所测试的 maximins 1 ~ 5 中, 发现 maximin 3 抗菌肽对人免疫缺陷病毒 HIV 有明显抑制作用, 选择指数达到 8, 而其他抗菌肽对 HIV 作用不显著。值得注意的是 maximin 3 抗菌肽具有特异性的组氨酸 C - 末端, 推测在其特有的抗 HIV 中发挥了重要作用。研究结果提示了利用这一类碱性抗菌肽开发抗病毒活性肽的可能性 (Lai et al, 2002d)。Maximin 抗菌肽不具有溶血活性, 而 maximin H 抗菌肽则显示微弱的溶血活性 (在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下, 溶血率达 90%)。另一方面, 尽管目前已从自然界各种材料来源中分离鉴定了很多抗菌肽, 但它们对哺乳类的毒性还没有得到很好的研究, 大剂量腹腔注射 maximin 1 或 maximin 3 能引起小鼠的中毒症状, 包括喘息, 痉挛和紧张等。实验测定结果, maximin 1 和 maximin 3 对小鼠的 LD_{50} 分别为 8.2 和 4.3 mg/kg , 解剖小鼠后可观察到大面积皮下血管扩张。Maximin 抗菌肽引起小鼠死亡的毒理学机制目前尚不清楚, Northern 杂交

实验初步证明, 此类抗菌肽在蛙的脑区和胃肠道有表达, 提示它们具有目前未知的生物学功能。

1.1.4 分子多样性产生的机制 为了解大蹼铃蟾 maximin 及 maximin H 抗菌肽多样性的产生机制, 首先揭示了这些抗菌肽的基因结构。大蹼铃蟾基因组 DNA 的 Southern 杂交证明, 抗菌肽编码基因属于多拷贝基因家族。对 7 个抗菌肽基因的全序列测定表明, 它们的结构类似, 均由 3 个外显子组成。

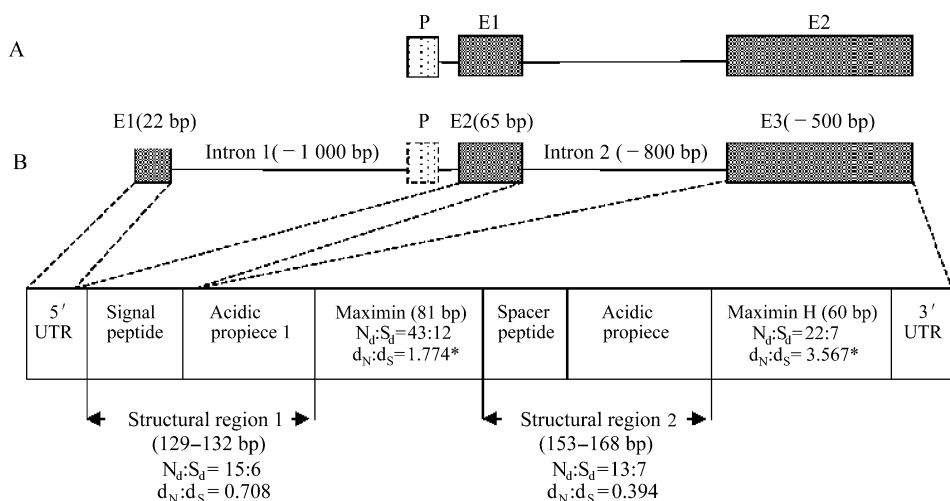


图 2 东方铃蟾 (A) 和大蹼铃蟾 (B) 抗菌肽基因结构 (引自 Lee et al, 2005a)

Fig. 2 Schematic gene structure of antimicrobial peptides from *B. orientalis* and *B. maxima* (cited from Lee et al, 2005a)

Exon number is indicated as Ex. P stands for a putative promoter.

分析不同结构区域所构建的基因树表明, 结构域重组 (domain shuffling) 或基因转换 (gene conversion) 在大蹼铃蟾抗菌肽的基因中是频繁发生的。分析 56 个抗菌肽编码 cDNA 发现, maximin 及 maximin H 编码区核酸的非同义位点核酸替换平均数 (d_N) 明显超过了同义位点核酸替换平均数 (d_S), 同样现象在其他结构区域, 如信号肽、酸性前肽、间隔肽中则未被发现, 揭示了大蹼铃蟾抗菌肽基因中 maximin 及 maximin H 经受着达尔文正选择驱动的快速进化, 是其抗菌肽多样性产生的根本原因 (Lee et al, 2005a)。

抗菌肽的作用机制目前认为是在与病原菌结合之后, 通过地毯样或桶穿孔机制破坏病原菌的细胞膜 (Shai, 1995; Epanand & Vogel, 1999)。在这一过程中, 抗菌肽亲水和疏水的部分在不同目标的特殊识别中可能起到了重要作用。进一步分析发现在 maximin 和 maximin H 中, 受到正选择的位点分布在 α -螺旋的不同位点, 可能用于解释所观察

到两个抗菌肽家族之间微生物选择性的差异 (Lai et al, 2002d, e), 同时也暗示了这两种抗菌肽在与病原微生物膜相互作用中采取不同的机制, 在 maximin 中可变位点的分布能够使它们对病菌选择的多样化, 而在 maximin H 中分布的模式能够改变它们与细菌膜的结合 (Lee et al, 2005a)。

1.2 maximin S 抗菌肽

在大蹼铃蟾中新发现了第三类抗菌肽, 命名为 maximin S 抗菌肽。五种 maximin S 抗菌肽中, maximin S1 长度较短, 只有 14 个氨基酸残基, 其余 4 个 (maximin S2 ~ 5) 都由 18 个氨基酸残基组成, 并且相互间相似度高达 83.3%。Maximin S 与 maximin 和 maximin H 在氨基酸序列上并没有明显的同源性。测定人工化学合成的 maximin S1 及 maximin S4 的活性结果表明, maximin S4 不具有抗菌及真菌活性, 而显示有抗支原体活性 (Wang et al, 2005)。

大蹼铃蟾面对着多种微生物, 如各种细菌、真

菌以及支原体的感染,其皮肤中多样化的抗菌肽对于其保持抗病原微生物的潜能和广泛的抗菌谱是必要的。病原微生物的多样性驱动了大蹼铃蟾皮肤抗菌肽的进化,以适应特定的微生物环境。

2 哺乳动物激素和神经递质的类似物

2.1 缓激肽 (bradykinin) 及其基因相关肽

2.1.1 结构特征与表达模式 Bombinainin M, 这一新的来源于大蹼铃蟾皮肤的缓激肽由 19 个氨基酸残基组成,与其他来源的缓激肽类分子在 N-端氨基酸序列上有显著的差异。四种编码该激肽的前体 cDNA 已被克隆,这是第一个得到的低等脊椎动物编码缓激肽基因的 cDNA 克隆 (Lai et al, 2001; Lee et al, 2005c)。其特征在前体由 1~8 个重复单元构成,并且与新发现的激肽增强肽 (实际是 bombinainin M 的 N-端变体) 激肽 B2 受体抑制剂 kinestatin (Chen et al, 2003a) 和缓激肽基因相关肽 (bombinakinin-GAP) 共同表达。Bombinakinin-GAP 是从大蹼铃蟾皮肤分泌物中分离得到的由 28 个氨基酸残基组成的一种单链新型多肽,其氨基酸全序列一级结构与人可卡因相关转录产物 CART 中间片段具部分相似性。初步活性测定表明, bombinakinin-GAP 具有抑制进食的生物效应 (Lai et al, 2003a)。图 3B 表示了这些 cDNA 结构的构造特点。克隆 115 编码包含 6 个 bombinakinin M 拷贝的前体蛋白质;克隆 112 编码包含 8 个 bombinakinin M 拷贝加一个 bombinakinin M-GAP 拷贝的前体蛋白质。克隆 578 与克隆 553 相比较,前者除了缺失一个 bombinakinin M 拷贝外,序列的差异性主要表现 bombinakinin M 变异体的编码区域,编码新的 bombinakinin M 变体中 15 个变异核苷酸中有 14 个是非同义突变,表明了进化过程中发生了高度的正选择。

2.1.2 生物学活性及环境适应意义 与缓激肽一样, bombinakinin M 具有豚鼠回肠收缩活性 (Lee et al, 2005c)。出乎预料的是,新近发现的 bombinakinin M 变体单独不具有对豚鼠回肠的收缩活性,而是表现出了对 bombinakinin M 的平滑肌收缩活性的增强作用。值得注意的是, bombinakinin M 中缓激肽片段的第一个精氨酸残基在 bombinakinin M 变体中被异亮氨酸替换。另一方面, DYTIRTRLH 多肽是依据克隆 578 和 553 相关的前体蛋白质的串联排列和潜在加工位点的存在而推断

得出的多肽,其天然存在形式还没有得到证实。有趣的是, DYTIRTRLH 多肽表现出与 bombinakinin M 变体 N-末端的明显序列同源性 (图 3A)。活性测定表明,它对 bombinakinin M 具有明显的抑制活性,而对缓激肽却没有抑制作用。

缓激肽介导了多种不同的生物学活性,包括降低血压、平滑肌收缩、疼痛等 (Regoli et al, 1997)。在前体蛋白质中 bombinakinin M 的多拷贝是大蹼铃蟾为抵御捕食而大量合成和释放这种“毒性”物质的有效方式。可以推测,在某种特定应急条件下, bombinakinin M 拷贝数的增加,通过 8 个碱基 (TGCGGGTA) 插入而开启具有抑制食欲功能的 bombinakinin-GAP 的翻译,以及 bombinakinin M 变体对 bombinakinin M 生物活性的增强都可以增加大蹼铃蟾对捕食者的对抗作用。但另一方面,这些“毒性”物质的大量合成释放可能也会对蛙自身造成伤害,尤其是在皮肤裸露的情况下。因此, DYTIRTRLH 多肽与 kinestatin 拮抗剂的存在可能在保护自身免遭这些“毒性”物质伤害中起到关键性的作用,正如它们的 cDNA 组合所揭示的一样,这些多肽生物合成模式提示一种精确的分子机制——抵御捕食者与自身保护的调节和平衡。

比较不同实验室对大蹼铃蟾 bombinakinin M cDNA 结构测定结果的差异进一步揭示了环境因素对这类“毒性”物质表达模式的影响。Bombinakinin M 的上述 4 种 cDNA 的类型是从新近捕获的野生大蹼铃蟾构建的 cDNA 文库中鉴定出来的。Chen et al (2003a, b) 报道了两种 bombinakinin M 的 cDNA 结构,其一包含 bombinakinin M 的 4 个串联重复;另一个包含 bombinakinin M 单拷贝加一个 kinestatin 单拷贝,这种差异可能是在 mRNA 提取之前,这些蛙的生存环境不同而引起的。我们实验中所用的动物是刚刚从野外捕获的,而 Chen 等利用的动物是在良好生存环境下生活了很长一段时间 (实验室饲养 4 年)。实验证据显示,与抗菌肽分子多样性相似,生存于野生环境的大蹼铃蟾中缓激肽相关多肽多样性和复杂性显著大于长期饲养的动物,反映出在某种生存环境中生物适应性的分子基础。揭示 bombinakinin M 的基因结构将有助于进一步阐明两栖类动物缓激肽相关多肽环境适应过程中分子调节机制及其生物学意义。

2.2 铃蟾肽 (bombesin) 及其基因相关肽

最早从欧洲铃蟾皮肤中分离得到了十四肽铃蟾

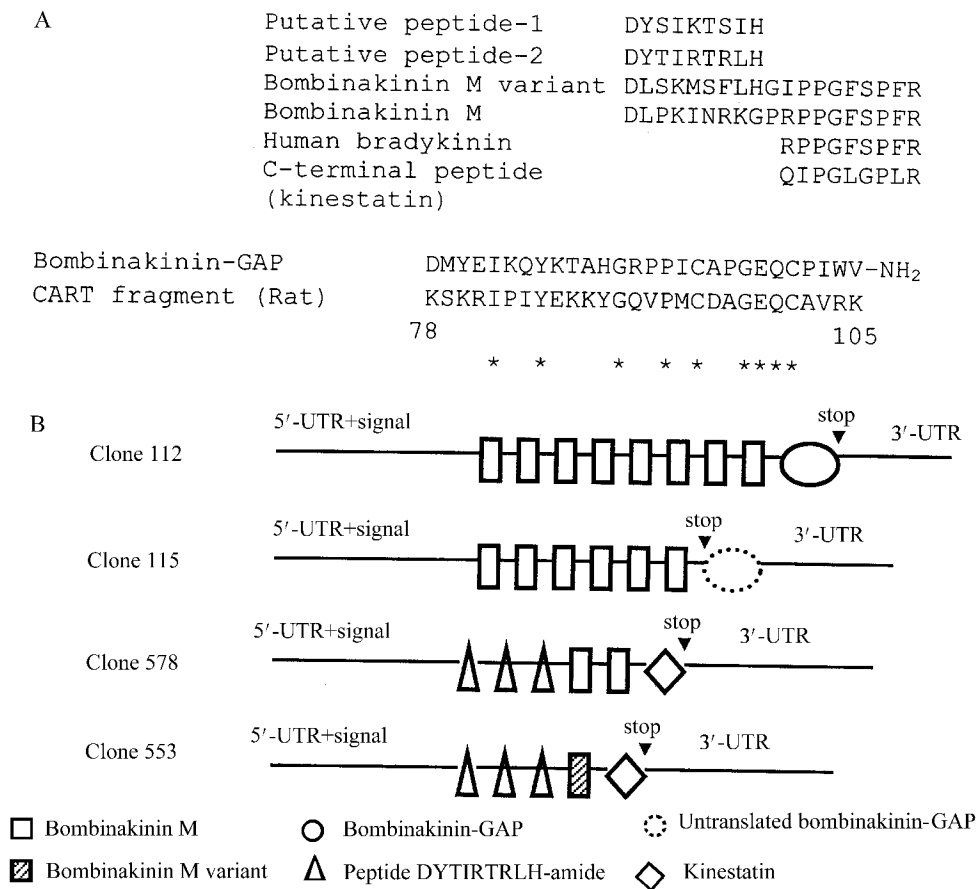


图 3 大蹼铃蟾皮肤缓激肽和基因相关肽结构 (A) 及其 mRNA 不同组成类型 (B) (引自 Lee et al, 2005c)

Fig. 3 (A) Bombinakinin M and its gene associated peptides, and (B) mRNAs encoding bradykinin-related peptides in *Bombina maxima* skin (cited from Lee et al, 2005c)

肽。铃蟾肽的研究导致了其哺乳类类似物促胃酸分泌素释放肽 (GRP) 和神经调节素 B (neuromedin B) 的发现。GRP 和 Neuromedin B 在胃肠道 (GI) 和中枢神经系统 (CNS) 中广泛分布 (Martinez & Tache, 2000), 介导了各种各样的生物学活性, 包括平滑肌的收缩、其他 GI 激素的分泌和中枢自我平衡机制的调节 (食欲、取食行为和体温调节) 等。从大蹼铃蟾的皮肤分泌物中分离得到一新的铃蟾肽相关多肽, 其一级结构是 pEKKPPRP-PQWAVGHFM-NH₂, 包含有 4 个脯氨酸和 3 个碱性氨基酸残基的氨基末端 (N-末端), 与其他来源的铃蟾肽有广泛的差异。因此, 把这一多肽命名为富含脯氨酸铃蟾肽 (PR-bombesin)。研究发现 PR-bombesin 对鼠胃底组织肌肉条具有收缩作用, 且与 Leu13-bombesin 相比较在强度和内在活性方面都有显著提高 (Lai et al, 2002f), 为其独特的片段所发挥的重要功能提供了第一证据。不同的铃蟾肽拥

有不同生理作用和独特性铃蟾肽受体亚型 (Moody & Merali, 2004), 更加详细的分析 PR-bombesin 在铃蟾肽不同受体亚型上的作用效果将是非常有意义的。

在对大蹼铃蟾皮肤 cDNA 文库的大规模测序中, 发现了另一类编码 PR-bombesin 的 cDNA (克隆 576, 图 4), 根据可能的双碱基加工位点推测了一个由 34 个氨基酸残基构成并含有一对二硫键的新的活性肽 (bombesin-GAP)。比较序列同源性, 没有发现任何肽与其同源。人工合成的 bombesin-GAP 对鼠胃肌肉条具有收缩作用, 但活性比 Leu13-bombesin 低到原来的 1% (Shen et al, 2005)。是否 bombesin-GAP 作用于铃蟾肽受体, 以及作用于鼠胃肌肉条的机制还需要进一步的研究。编码 PR-bombesin 加 bombesin-GAP (克隆 576) 和单独编码 PR-bombesin (克隆 126) 的 cDNA 结构分析后, 发现 bombesin-GAP 的翻译是通过一个 146

个碱基的复制来启动的；有趣的是，插入的 146 个碱基的片段是两段 cDNA 都具有的 210 ~ 355 位碱基的完全重复拷贝。因为非正确的翻译阅读框架，bombesin-GAP 在克隆 126 类型的 mRNA 中不能被翻译。这同样反映了两栖类皮肤中生物活性肽表达调节的精确分子机制。目前所要解决的问题是 PR-bombesin 和 bombesin-GAP 的基因结构，以及 bombesin-GAP 的天然存在形式，及其确切生物学功能和作用靶点。

2.3 神经调节素 U

神经调节素 U 最初是从猪的脊髓中分离得到的，并因其子宫收缩活性而命名 (Minamino et al, 1985)。神经调节素 U 的生物学功能包括刺激子宫平滑肌收缩，调节肠系膜血流和肠道的离子转运。它还可以影响激素系统，包括对腺垂体前叶和肾上腺紧张相关调节剂的释放作用。最近，有两个结构相关的 G 蛋白偶联的受体被确认为神经调节素 U 的受体，其中一个优先表达于外周组织；另一个主要表达于中枢神经系统 (Brighton et al, 2004)。从大蹼铃蟾的皮肤分泌物中分离到一种新的神经调节素 U 类似物 Bm-NmU-17。它由 17 个氨基酸残基组成，一级结构确定为：DSSGIVGRPFLLFRPRN-NH₂，其 N 末端的部分与其他来源的神经调节素 U 相比，序列上有明显的变异 (Lee et al, 2005d)。Bm-NmU-17 具有大鼠子宫角平滑肌浓度依赖性收缩作用。目前需针对 Bm-NmU-17 对神经调节素 U 不同受体亚型的作用进行进一步深入的分析。

2.4 Bv8 样肽

从大蹼铃蟾皮肤分泌物中分离得到两种由 77 个氨基酸残基组成的生物活性肽 (Lai et al, 2003b)。用 FASTA 同源序列搜索软件在数据库中进行搜索，发现它们和 Bv8 肽序列具有 80% 左右的同源性 (Mollay et al, 1999)。因此，将它们分别命名为 Bv8 样肽 1 (Bv8-LP1) 和 Bv8 样肽 2 (Bv8-LP2)。Bv8 肽的一级结构和黑色树眼镜蛇 (*Dendroaspis polylepis polylepis*) 毒液的组成成分蛋白质 A 高度同源。用分离的豚鼠回肠检测纯化的 Bv8-LP1 和 2 的活性，这些 Bv8 样肽在 nM 浓度时就能刺激平滑肌的收缩，而且 Bv8-LP1 对平滑肌标本的收缩活性比 Bv8-LP2 更强。Bv8 样肽的序列比较揭示有若干氨基酸残基的替换发生。在第 62 位发生了一个明显的替换，Asn 替换为 Lys，这与两者间的活性差异可能有重要关系。Bv8 的哺乳动物

类似物 EG-VEGF，与 Bv8 样肽一样具有相同的 N - 末端序列和半胱氨酸分布方式，目前已证明在体内具有促内皮细胞分裂的作用。作为组织选择性的血管生成因子，它们作用于 G 蛋白偶联受体，该类受体与神经肽 Y 受体同源 (LeCouter & Ferrara, 2003)。

3 三叶型蛋白——新型血小板激动剂

在哺乳动物中，三叶型家族 (trefoil factor family, TFF) 蛋白涉及黏膜的维持和修复作用，且它们也涉及到肿瘤抑制和癌症发生。TFF 蛋白的生物学机制一直不完全了解，推导的 TFF 受体或识别位点还没有得到确切的证实 (Sands & Podolsky, 1996; Emami et al, 2004)。从大蹼铃蟾皮肤分泌物中纯化和克隆得到一个新的有两个结构域的 TFF 蛋白 (Bm-TFF2)。目前的研究显示 Bm-TFF2 具有整合素 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 依赖性血小板活化活性 (Zhang et al, 2005)。与由 stejnluxin (一个血小板糖蛋白 GPIV 激动剂, Lee et al, 2003) 活化引起的血小板聚集不同，PLC γ 2 在 Bm-TFF2 诱导的血小板聚集中不被磷酸化。Bm-TFF2 是第一个被报道的具有人血小板活化活性的 TFF 蛋白质。初步研究结果表明，Bm-TFF2 激活血小板的作用机制不同于以往的血小板激动剂，将作为一种有用的分子探针在研究血小板活化和其信号传导通路中起作用，Bm-TFF2 也为研究相关的 TFF 蛋白质结构 - 功能之间关系提供一种新的可能。

4 小分子蛋白酶抑制剂

丝氨酸蛋白酶抑制剂在蛋白酶生理功能的调节中具有重要作用，还参与机体的天然免疫应答和癌症发生 (Bode & Huber, 2000)。在对 6 种两栖类皮肤分泌物所做的生物学活性初步检测中，我们发现胰蛋白酶抑制活性普遍存在于所有测定的物种分泌物中 (Lai et al, 2002b)。一些蛋白酶抑制剂已经从两栖类的皮肤分泌物中鉴定和分离出来，如来自多彩铃蟾的皮肤分泌物的 BSTI (Mignogna et al, 1996)，从华西蟾蜍 (*Bufo andrewsi*) 的皮肤分泌物中分离得到的 22 kDa 的竞争性抑制剂和 50 kDa 的 serpin 类不可逆抑制剂 (Zhao et al, 2005a, b)。从大蹼铃蟾的皮肤分泌物中鉴定和纯化了一种新的胰蛋白酶抑制剂，并命名为 BMTI，由 60 个氨基酸残基组成 (Lai et al, 2002g)。它与 BSTI 有 81.7 %

Clone-576	ctcagactctcacagctctgcggtactcacagcttttagacATGTCCTGCAATTCCTCTGAAC	61
Clone-126		
	M S A I P L N	7
		
Clone-576	AGGATCCTGCCTCTAGGGTTCCTATTTTGCCTGCTTCTTTCCTCCTTCATTTCTCTGTCCAGC	124
Clone-126		
	R I L P L G F L F C L L L S S F I S L S S	28
		
Clone-576	TGCATGGAGTTTCGTTGAAGATGCCAACATCAGGGCAGAATCAGCCTGCAGAAGAAGCCACCC	187
Clone-126		
	C M E F V E D A N N Q G R I S L Q K K P P	49
		
Clone-576	CGGCCACCCAGTGGGCAGTGGGTCAC TTCATGGGTAAGAAGAGCCTGCAAGACATGGACTTT	250
Clone-126		
	R P P Q W A V G H F M G K K S L Q D M D F	70
		
Clone-576	GAAGAGATGGGAAGTTTGTCTAAACGTAGCGTTGAGAAGATTAGAGCTGCTCTCCTGCAAGAG	313
Clone-126		
	E E M G S F A K R S V E K I R A A L L Q E	91
		
Clone-576	CAGCAAGGAGCAGGATCAGAAAGAGAGCTGCGGCATGCACAGGTCAC TTCATGGGTAAGAAGA	376
Clone-126		
	Q Q G A G S E R E L R H A Q V T S W V R R	112
		
Clone-576	GCCTGCAAGACATGGACTTTGAAGAGATGGGAAGTTTGTCTAAACGTAGCGTTGATAAGATTA	439
Clone-126		
	A C K T W T L K R W E V L L N V A L I R L	133
	- - - - -	
Clone-576	GAGCTGCTCTCTGTCAGGAGCAGCAAGGATCAGGATCAGAAAGAGAGCTGCGGCATGCACAGT	502
Clone-126		
	E L L S C R S S K D Q D Q K E S C G M H S	154
	- - - - -	
Clone-576	TGGTAGcaaggggagatcttggcgagatctggagaatatgcagaattagcaagaaatgtgt	565
Clone-126	CAAGGGAGATCTTGGCGCAGTATCTGGAGAATATGCAGAATTAG.....t.	
	W *	155
	L V A R E I L A Q Y L E N M Q N *	
Clone-576	cctcctgtacatacagaaatataaataaatatatttgtgcctgagatatgggacttattttac	628
Clone-126		
Clone-576	acatttccaaa-gtttattgtttacaaaaaacaaccaaactgaagtctaagacaatgag	691
Clone-126	a.....	
Clone-576	aatttttcatttataattttaatttagcagccattttctaaagttaagttaaaacaaaactca	754
Clone-126		
Clone-576	tcttcagagtatgtacggaatatttttgtctgccattttatgcagtggttctaactaaaacctg	817
Clone-126		
Clone-576	tgaataaaagacattctttgcacacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	867
Clone-126	-----	

图 4 两种编码 PR-bombesin 的 mRNA 比较 (引自 Shen et al , 2005)

Fig. 4 Nucleotide sequence of PR-bombesin plus bombesin-GAP cDNA and predicted amino acid sequence of the PR-bombesin plus bombesin-GAP precursor protein and comparison with those of PR-bombesin alone from *Bombina maxima* (cited from Shen et al , 2005)

的序列一致性，表明它们是铃蟾属不同物种的同源物，但与 BSTI 不同，BMTI 不具备凝血酶抑制活性。目前，蛋白酶抑制剂在两栖类皮肤分泌物中大量存在，其生物学功能还不清楚，推测可能在皮肤分泌物其他生物活性肽加工过程中起到了调节的作用；另一方面，这些皮肤的蛋白酶抑制剂可能直接或间接地参与抵御外界生物的入侵，类似于植物中

的很多蛋白酶抑制剂具有的防御功能，如通过抑制昆虫的蛋白酶，以抵抗害虫的侵袭 (Laskowski & Qasim , 2000)。

5 皮肤白蛋白

5.1 白蛋白的皮肤表达

白蛋白 (albumin) 是血液循环系统中各种内

源和外源复合物的运输蛋白和储存蛋白。这些复合物包括金属、脂肪酸、氨基酸、代谢物和许多药物复合物。因此,白蛋白最重要的生理作用是将这些血流中的溶质运到靶器官,并维持血浆的 pH 和渗透压;在哺乳动物中,白蛋白由肝脏细胞合成并分泌到血液中 (Peters, 1996; Kragh-Hansen et al, 2002)。从大蹼铃蟾中首次确认了白蛋白在皮肤中的大量表达 (Zhang et al, 2005a, b)。免疫组化实验表明,大蹼铃蟾皮肤白蛋白广泛分布在外皮层细胞膜上和真皮海绵层内。随后,在其他种类蛙的皮肤中,如非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 和华西蟾蜍 (*B. andrewsi*) (Zhao et al, 2005c), 也观察到了白蛋白的表达。有理由相信,这些白蛋白在皮肤的广泛分布,尤其是在表皮的广泛分布将极大地作用于从其生活的环境中摄取生存必须的物质。目前的研究还发现了一个有趣的现象,与血清白蛋白不同,大蹼铃蟾皮肤白蛋白含有血红素 b 辅基 (0.95 mol/L 蛋白质)。皮肤呼吸在两栖类动物中占有重要地位 (Duellman & Trueb, 1986), 大蹼铃蟾皮肤白蛋白的血红素是否结合氧气及其在蛙类皮肤呼吸中的相关功能还在研究中。阐明两栖类皮肤中白蛋白的表达和积累,对了解两栖类皮肤的生理功能包括皮肤呼吸、水分保持、代谢物交换、渗透压调节等都有重要的意义。

5.2 白蛋白作为丝氨酸蛋白酶抑制剂

以往的文献中,还没有关于白蛋白直接作为丝氨酸蛋白酶有效抑制剂的报道。研究发现大蹼铃蟾白蛋白是一种新型有效的蛋白酶抑制剂,其通过由一对二硫键 Cys⁵³—Cys⁶²形成的一个暴露的活性位点环,以 1:1 分子摩尔比同胰蛋白酶 (trypsin) 形成稳定的非共价结合的复合物,反应活性位点为 Arg⁵⁸ (P₁)—His⁵⁹ (P₁')。大蹼铃蟾白蛋白代表了一个胰蛋白酶抑制剂新家族的第一个成员,将成为

研究蛋白酶—抑制剂相互作用的有用工具。研究中发现,纯化的非洲爪蟾 (*X. laevis*) 68 kDa 血清白蛋白也有显著的胰蛋白酶抑制活性,但是该活性要比大蹼铃蟾白蛋白低了 75% (Zhang et al, 2005c)。由于具有胰蛋白酶抑制剂活性,大蹼铃蟾白蛋白可以直接或间接地作为防御性物质来抵抗天敌,暗示了物种对特定环境的适应性。

6 小 结

以中国产大蹼铃蟾所进行的两栖类皮肤分泌物蛋白质多肽组研究表明:(1) 两栖类皮肤分泌物蛋白质多肽是自然界中进化生成的一类既与哺乳动物蛋白质多肽相似,又存在相当程度上的结构与功能分化的生物分子。在长期的进化过程中,形成了特定的蛋白质多肽家族,其特点在于结构新颖,分子多样性丰富。(2) 为开拓和适应广阔的栖息地及多样的生态条件,两栖类皮肤分泌物功能基因组具有多样性丰富、快速重组突变的特征,是探讨生物适应的基因基础、基因形成机制和进化特性等生物学基本问题的优秀模型。(3) 两栖类皮肤分泌物功能蛋白质多肽发现与确立,以及结构与功能的研究都为探索对应的哺乳类动物类似蛋白质多肽结构与功能提供模板分子,同时也为生物医学研究,探讨特定细胞群(如血小板、血管内皮细胞、免疫细胞、神经细胞等)膜受体分子和特定蛋白质分子在生理、病理过程中的功能提供了专一性强的分子探针。(4) 两栖类皮肤分泌物功能蛋白质多肽在有关神经系统、心血管系统疾病、抗肿瘤、抗病毒、减肥与新型抗生素等创新药物的开发研究都具有相当的潜力与良好的应用前景,为新药物靶点的发现与确立、新一代创新药物开发、新的临床诊断试剂研制等提供了坚实的理论基础及先导结构和单体。

参考文献:

- Barra D, Simmaco M. 1995. Amphibian skin: A promising resource for antimicrobial peptides [J]. *Trends Biotechnol*, **13**: 205–209.
- Bevins CL, Zasloff M. 1990. Peptides from frog skin [J]. *Annu Rev Biochem*, **59**: 395–414.
- Brighton PJ, Szekeres PG, Willars GB. 2004. Neuromedin U and its receptors: Structure, function, and physiological roles [J]. *Pharmacol Rev*, **56**: 231–248.
- Bode W, Huber R. 2000. Structural basis of the endoprotease-protein inhibitor interaction [J]. *Biochim Biophys Acta*, **1477**: 241–252.
- Chen T, O'Rourke M, Orr DF, Coulter DJM, Hirst DG, Rao P, Shaw C. 2003a. Kinestatin: A novel bradykinin B2 receptor antagonist peptide from the skin secretion of the Chinese toad *Bombina maxima* [J]. *Regulatory Pept*, **116**: 147–154.
- Chen T, Bjourson AJ, McClean S, Orr DF, O'Kane EJ, Rao P, Shaw C. 2003b. Cloning of maximakinin precursor cDNAs from Chinese toad *Bombina maxima* venom [J]. *Peptides*, **24**: 853–861.
- Clarke BT. 1997. The natural history of amphibian skin secretions, their normal function and potential medical applications [J]. *Biol Rev*, **72**: 365–379.
- Daly JW. 1995. The chemistry of poisons in amphibian skin [J]. *Proc*

- Natl Acad Sci USA*, **92**: 9–13.
- Duellman WE, Trueb L. 1986. Relationship with the environment [A]. Duellman WE, Trueb L. Biology of Amphibians [C]. New York: McGraw-Hill, Inc, 197–228.
- Emami S, Rodrigues S, Rodrigue CM, Le Floch N, Rivat C, Attoub S, Bruyneel E, Gespach C. 2004. Trefoil factor family (TFF) peptides and cancer progression [J]. *Peptides*, **25**: 885–898.
- Epand RM, Vogel HJ. 1999. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanism of action [J]. *Biochim Biophys Acta*, **1462**: 11–28.
- Ersparmer V. 1971. Biogenic amines and active polypeptides of amphibian skin [J]. *Annu Rev Pharma*, **2**: 327–350.
- Fei L, Ye CY, Jiang JP, Xie F, Huang YZ. 2005. An Illustrated Key to Chinese Amphibians [M]. Chengdu: Sichuan Publishing House of Science and Technology. [费 梁, 叶昌媛, 江建平, 谢 锋, 黄永昭. 2005. 中国两栖动物检索及图解. 成都: 四川科学技术出版社.]
- Frost DR. 2002. Amphibian species of the word [EB/OL]. <http://research.amnh.org/herpetology/amphiba/index.html> (American Museum of Natural History).
- Gibson BW, Tang DZ, Mandrell R, Kelly M, Spindel ER. 1991. Bombinin-like peptides with antimicrobial activity from skin secretions of the Asian toad, *Bombina orientalis* [J]. *J Biol Chem*, **266**: 23103–23111.
- Kragh-Hansen U, Chuang VT, Otagiri M. 2002. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin [J]. *Biol Pharm Bull*, **25**: 695–704.
- Lai R, Liu H, Lee WH, Zhang Y. 2001. A novel bradykinin-related peptide from skin secretions of toad *Bombina maxima* and its precursor containing six identical copies of the final product [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **286**: 259–263.
- Lai R, Zhao Y, Liu H, Zhang YJ, Lee WH, Zhang Y. 2002a. Bioactive substance of amphibian skin and a study on exploitation and utilization of Chinese amphibian resources [J]. *Zool Res*, **23** (1): 65–70. [赖 仞, 赵 宇, 刘 衡, 张玉洁, 李文辉, 张 云. 2002a. 两栖类动物皮肤活性物质的利用和中国两栖类资源开发的策略. 动物学研究, **23**: 65–70.]
- Lai R, Zhao Y, Yang DM, Zha HG, Lee WH, Zhang Y. 2002b. Comparative study of the biological activities of the skin secretions from six common Chinese amphibians [J]. *Zool Res*, **23**: 113–119. [赖 仞, 赵 宇, 杨东明, 查宏光, 李文辉, 张 云. 2002b. 六种常见两栖类动物皮肤分泌物生物活性的比较. 动物学研究, **23** (2): 113–119.]
- Lai R, Yang DM, Lee WH, Zhang Y. 2002c. Biological activities of skin secretions of Salamander *Tylotriton verrucosus* [J]. *J Natural Toxins*, **11**: 234–238.
- Lai R, Zheng YT, Shen JH, Liu GJ, Liu H, Lee WH, Tang SZ, Zhang Y. 2002d. Antimicrobial peptides from the skin secretion of Chinese red belly toad *Bombina maxima* [J]. *Peptides*, **23**: 427–435.
- Lai R, Liu H, Lee WH, Zhang Y. 2002e. An anionic antimicrobial peptide from skin secretions of toad *Bombina maxima* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **295**: 796–799.
- Lai R, Liu H, Lee WH, Zhang Y. 2002f. A novel bombesin-like peptide from *Bombina maxima* [J]. *Peptides*, **23**: 437–442.
- Lai R, Liu H, Lee WH, Zhang Y. 2002g. Identification and cloning of a trypsin inhibitor from skin secretions of Chinese red belly toad *Bombina maxima* [J]. *Comp Biochem Physiol B*, **131**: 47–53.
- Lai R, Liu H, Lee WH, Zhang Y. 2003a. Bombinakinin M gene associated peptide, a novel bioactive peptide from skin secretions of the toad *Bombina maxima* [J]. *Peptides*, **24**: 199–204.
- Lai R, Liu H, Lee WH, Zhang Y. 2003b. Two novel Bv8-like peptides from skin secretions of toad *Bombina maxima* [J]. *Comp Biochem Physiol B*, **134**: 509–514.
- Laskowski M, Qasim MA. 2000. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes [J]. *Biochim Biophys Acta*, **477**: 324–337.
- LeCouter J, Ferrara N. 2003. EG-VEGF and Bv8, a novel family of tissue-selective mediators of angiogenesis, endothelial phenotype, and function [J]. *Trends Cardiovasc Med*, **13**: 276–282.
- Lee WH, Du XY, Lu QM, Clemetson KJ, Zhang Y. 2003. Stejnulxin, a novel snake C-type lectin-like protein from *Trimeresurus stejnegeri* venom is a potent platelet agonist acting specifically via GPVI [J]. *Thromb Haemost*, **90**: 662–671.
- Lee WH, Li Y, Lai R, Li S, Zhang Y, Wang W. 2005a. Variety of antimicrobial peptides in the *Bombina maxima* toad and evidence of their rapid diversification [J]. *Eur J Immunol*, **35**: 1220–1229.
- Lee WH, Zhang J, Zhang YX, Jin Y, Lai R, Zhang Y. 2005b. Maximin 9, a novel free thiol containing antimicrobial peptide with antimycoplasmal activity from frog *Bombina maxima* [J]. *FEBS Lett*, **579**: 4443–4448.
- Lee WH, Liu SB, Shen JH, Jin Y, Zhang Y. 2005c. Cloning of bradykinin precursor cDNAs from skin of *Bombina maxima* reveals novel bombinakinin M antagonists and a bradykinin potential peptide [J]. *Regulatory Pept*, **127**: 207–215.
- Lee WH, Liu SB, Shen JH, Jin Y, Lai R, Zhang Y. 2005d. Identification and molecular cloning of a novel neuromedin U analog from the skin secretions of toad *Bombina maxima* [J]. *Regulatory Pept*, **129**: 43–47.
- Martinez V, Tache Y. 2000. Bombesin and the brain-gut axis [J]. *Peptides*, **21**: 1617–1625.
- Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. 1985. Neuromedin U-8 and U-25: Novel uterus stimulating and hypertensive peptides identified in porcine spinal cord [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **130**: 1078–1085.
- Mignogna G, Pascarella S, Wechselberger C, Hinterleitner C, Mollay C, Amiconi G, Barra D, Kreil G. 1996. BSTI, a trypsin inhibitor from skin secretions of *Bombina bombina* related to protease inhibitors of nematodes [J]. *Protein Sci*, **5**: 357–362.
- Mollay C, Wechselberger C, Mignogna G, Negri L, Melchiorri P, Barra D, Kreil G. 1999. Bv8, a small protein from frog skin and its homologue from snake venom induce hyperalgesia in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, **374**: 189–196.
- Moody TW, Merali Z. 2004. Bombesin-like peptides and associated receptors within the brain: Distribution and behavioral implications [J]. *Peptides*, **25**: 511–520.
- Peters T Jr. 1996. All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Application [M]. New York: Academic Press.
- Regoli D, Rizzi A, Cab G. 1997. Pharmacology of the kallikrein-kinin system [J]. *Pharmacol Res*, **35**: 513–515.
- Sands BE, Podolsky DK. 1996. The trefoil peptide family [J]. *Annu Rev Physiol*, **58**: 253–273.
- Shai Y. 1995. Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides [J]. *Trends Biochem Sci*, **20**: 460–464.
- Shen JH, Huang X, Li WH, Wei Q, Lu YP, Yang YR, Zhang Y, Tang XD. 2002. Effects of *Bombina maxima* protein on growth of bladder cancer cell lines and expression of telomerase [J]. *Chin Pharmacol Bull*, **18** (2): 136–138. [申吉泓, 黄 翔, 李文辉, 魏 强, 卢一平, 杨宇如, 张 云, 唐孝达. 2002. 大蹼铃蟾蛋白提取物对膀胱癌细胞株的抑制作用及端粒酶的影响. 中国药理学通报, **18** (2): 136–138.]
- Shen JH, Guan RY, Zhang JH, Li WH, Zhang Y. 2003. The competitive experiment of maximin-2 on expression of HLA-DR HLA-ABC by cultured bladder cancer cell lines [J]. *Chin Pharmacol Bull*, **19** (9): 995–998. [申吉泓, 官润云, 张建华, 李文辉, 张 云. 2003. 大蹼铃蟾抗菌肽-2对膀胱癌细胞株 HLA-ABC 以及 DR 表达影响的对照实验研究. 中国药理学通报, **19** (9): 995–998.]
- Shen JH, Liu SB, Zhang YX, Jin Y, Lee WH, Zhang Y. 2005. Cloning

- of novel bombesin precursor cDNAs from skin of *Bombina maxima* [J]. *Regulatory Pept*, **132**: 102–106.
- Simmaco M, Barra D, Chiarini F, Noviello L, Melchiorri P, Kreil G, Richter K. 1991. A family of bombinin-related peptides from the skin of *Bombina variegata* [J]. *Eur J Biochem*, **199**: 217–222.
- Wang T, Zhang J, Shen JH, Jin Y, Lee WH, Zhang Y. 2005. Maximins S, a novel group of antimicrobial peptides from toad *Bombina maxima* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **327**: 945–951.
- Zaslloff M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms [J]. *Nature*, **415**: 389–395.
- Zhang J, Zhang Y, Wan SG, Wei SS, Lee WH, Zhang Y. 2005. Bm-TFF2, a trefoil factor protein with platelet activation activity from frog *Bombina maxima* skin secretions [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **330**: 1027–1033.
- Zhang YX, Lai R, Lee WH, Zhang Y. 2005a. Frog albumin is expressed in skin and characterized as a novel potent trypsin inhibitor [J]. *Protein Sci*, **14**: 2469–2477.
- Zhang YX, Wang YY, Lee WH, Zheng YT, Zhang Y. 2005b. Apoptotic activity of frog *Bombina maxima* skin albumin [J]. *Comp Biochem Physiol B*. (in press)
- Zhang YX, Lee WH, Zhang Y. 2005c. Purification and trypsin inhibitory activity of *Xenopus laevis* serum albumin [J]. *Zool Res*, **26** (6): 621–626. [张英霞, 李文辉, 张云. 2005. 非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 血清白蛋白的分离纯化及胰蛋白酶抑制活性. *动物学研究*, **26** (6): 621–626.]
- Zhao Y, Jin Y, Lee WH, Zhang Y. 2005a. Isolation and characterization of a 22-kDa protein with trypsin inhibitory activity from toad *Bufo andreus* skin [J]. *Toxicon*, **46**: 277–281.
- Zhao Y, Jin Y, Wei SS, Lee WH, Zhang Y. 2005b. Purification and characterization of an irreversible serine protease inhibitor from skin secretions of *Bufo andreus* [J]. *Toxicon*, **46**: 635–640.
- Zhao Y, Jin Y, Wang JH, Wang RR, Yang LM, Lee WH, Zheng YT, Zhang Y. 2005c. A novel heme-containing protein with anti-HIV-1 activity from skin secretions of *Bufo andreus* [J]. *Toxicon*, **46**: 619–624.

《动物学研究》第六届所内编委扩大会在昆明召开

秉承“开放获取”的办刊理念,《动物学研究》第六届编委会第二次所内编委扩大会议于2005年12月22日在昆明动物研究所召开。所内编委、信息中心全体人员及相关部门的负责人应邀出席了会议。

会议由副主编蔡景霞研究员主持。会议主要议程为:1)由编辑部主任单访同志汇报本届编委会的工作;2)听取与会者对本届工作的意见和今后工作的建议;3)商议下一届编委组成原则。

会议在完成既定议程的同时,就《动物学研究》的定位、方向和目标展开了热烈讨论,与会人员一致认为:本届编委会力量较强,在《动物学研究》的学术质量和网络版建设方面相当努力;目前,《动物学研究》的发展呈稳定的态势,在国内外享有一定的声誉。然而,其发展也正处于十字路口,期刊原先的定位和方向随着动物学研究领域的不断拓展和世界生命科学的发展,其窗口作用已经减弱,而仅仅作为国内科技创新和成果交流平台的作用,也已不能适应当代动物学研究发展的要求。面对国内期刊正处于重新“洗牌”时期,《动物学研究》也面临着何去何从以及更加严峻的挑战。大家认为,这需要进行系统、认真、谨慎的调研和决策,并从长计议。目前的压力,既是挑战,但同时也是一种机遇,编辑部应调研和借鉴一些期刊的运作方式,探索新的路子。与会学科组长和职能部门也表示,应通过编委职责及所内政策给予积极支持,共同携手并进。

会议对下届编委的遴选原则也提出了一些具体可行的指导性意见和建议,大家还集思广益,探讨了不少期刊发展的新思路及切实发挥编委组稿和学术指导作用的措施和办法。相信这些意见和建议对《动物学研究》未来发展将起到极大的推动和促进作用。