

蜂毒生物活性探討及基因轉殖表現

杜武俊*、張正鵬、楊景岳

國立中興大學昆蟲學系

摘 要

蜜蜂 *Apis mellifera* 與黃腰虎頭蜂 *Vespa affinis* 之蜂毒呈酸性黃色透明液體，*A. mellifera* pH 值約 5.5，*V. affinis* pH 值介於 6.0 - 6.5；兩者均具抗菌性、溶血性以及細胞毒殺作用。分別以 *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* CCRC 15211; CCRC 12652 等五動物病原菌株及兩種植物病原細菌 *Acidovorax avenae*, and *Erwinia carotovora* 動進行蜂毒抑菌性試驗，結果顯示兩種蜂毒對供試菌株均具抑制作用，最低抑菌濃度(MIC)為 *A. mellifera* 對 *K. pneumoniae* 的 2^{-8} 至 *S. aureus* 的 2^{-13} ；*V. affinis* 對 *E. coli* 的 2^{-8} 至 *V. parahaemolyticus* 的 $< 2^{-16}$ 。蜂毒抑菌成份對熱具穩定性，100 處理 15 分鐘蜜蜂蜂毒不減抑菌效果，黃腰虎頭蜂蜂毒略受影響，此結果指出蜂毒中抑菌成份可能為 peptide。以抗性品系進行測試，蜜蜂蜂毒可與抗生素以及 70%酒精產生抑菌協力作用。另外，構築家馬蜂 *Polistes jadwigae* 蜂毒成份 mastoparan (polistes MP)之 cDNA 於大腸桿菌外來基因表現系統之載體 pET21b，經轉殖入 *E. coli* BL21(DE3)，以 IPTG 誘發表現後，對宿主菌體產生生長抑制作用，以掃描式電顯觀察菌體表面呈穴狀凹陷。分離誘發表現之菌體與菌液，進一步測試發現菌液無抑菌作用，將菌體以低溫高壓爆破法擊碎後測試抑菌活性，結果顯示對 *V. parahaemolyticus* 具抑菌活性，表示蜂毒成份具基因轉殖表現之可行性。

關鍵詞：蜂毒、蜜蜂、胡蜂、生物活性。

前 言

蜜蜂 *Apis mellifera* 為膜翅目(Hymenoptera)、蜜蜂科(Apidae) 蜜蜂屬 (genus *Apis*)的昆蟲，不僅是目前進化最完整的真社會性(eusocial)昆蟲之一，也是屬於較為古老的昆蟲(Alexander, 1991; Engel, 1998)。蜜蜂的起源一般認為距今約一億四千七百萬年前的白堊紀(Cretaceous)時期，當開花植物出現時，蜜蜂的祖先便出現在地球上；而由西德所發現的蜜蜂化石來判斷，在三千八百萬年前的漸新世(Oligocene)初期的蜜蜂其外部形態與現存之種類無多大的差異(Engel, 1998)。人類更在西元前約七千年左右便已經懂得利用以蜂蜜為主的蜂產品。至今人類利用的蜂產品主要為蜂膠、蜂王漿、蜂蜜、花粉及毒質。

蜜蜂毒質為由工蜂腹部內的毒腺分泌而儲存於毒囊的有毒液體，毒液無色透明、呈酸性 pH 約為 5.5、與水的比重約為 1.13、略帶苦味、芳香氣味且可溶於水、酸性液體及醇類中(Shipolini, 1984)。蜜蜂進行防禦攻擊時藉由螫針將毒質注入侵入者體內，一般被蜂螫後，症狀輕微者可能僅侷限被螫部位產生疼痛、紅腫、發熱等症狀；而嚴重者則可能有嘔吐、頭痛、肌肉抽搐、腎衰竭等現象，更有甚者會有廣泛性皮膚、呼吸道或全身性之血管反應，嚴重者導致死亡(Lariviere and Melzack, 1996; Pursley, 1973)。同為社會性昆蟲的黃腰虎頭蜂(*Vespa affinis*)為胡蜂科(Vaspidae)的昆蟲，被歸為有毒昆蟲，其毒液對人體造成的傷害往往大於蜜蜂蜂毒，不乏遭虎頭蜂螫死之相關報導。黃腰虎頭蜂蜂毒為黃色透明液體，pH 值介於 6.0-6.5。目前國內外對於蜂毒已有許多相關的研究，然大多針對蜂毒藥理進行探討(Schmidt *et al.*, 1993)，對於其他的應用尚屬於初步研究階段，相關文獻亦不多。本文即針對蜜蜂及黃腰虎頭蜂的蜂毒進行毒質抗菌、溶血等生物活性探討；另外亦針對抗菌蛋白之 cDNA 進行基因選殖及其表現之探討。

蜂類毒質之生物活性及其應用

蜂毒對哺乳動物具毒殺作用(Habermann, 1971; Schumacher, *et al.*, 1986; Schumacher, *et al.*, 1990; Schmidt *et al.*, 1993; Schmidt, 1995)，寄生蜂之毒質亦對昆蟲具有神經麻痺及毒殺作用(Konno *et al.*, 2002)。黑腹虎頭蜂 *Vespa basalis* 毒液具會引起老鼠皮下水腫之胜肽成份(Ho *et al.*, 1998)。*Vespa orientalis* 之毒囊萃取物具有 serine and metalloprotease 的活性，可影響凝血作用(Kornberg *et al.*, 1988)。另外，蜜蜂及虎頭蜂之蜂毒均具溶血性(Schmidt, 1995; Ho *et al.*, 1998)。雖然蜂毒會對人體造成危害，可是另一方面也常常被利用於民俗醫療，毒質的應用傳統上主要用於蜂螫療法(bee venom therapy, BVT)，即利用螫針扎刺人體的特定穴位，以進行診療，一般認為對於類風濕關節炎、神經炎及高血壓皆有明顯的療效(Krochmal, 1994; Marz, 1993; Wilkinson, 1995; Kang *et al.*, 2002)；試驗證實蜜蜂 *A. mellifera* 之毒液在患有類風濕關節炎的老鼠身上可以有效發揮抗神經疼痛以及抗炎症的作用(Kwon *et al.*, 2002)。蜂毒療法早在明代李時珍所著的<本草

綱目>便已有記載，距今也有三千年左右的歷史，現今在中國、日本、瑞士等都有蜂療醫院的設置。雖然蜜蜂毒質被人類利用已有數千年的歷史，然由於其組成十分複雜因此直至近二十年其組成才被較完整的分離出，蜜蜂蜂毒 80-88%為水分，其餘蛋白質占 75%，鈣、鎂、銅、鈉、鉀等元素占 3.67%，此外也含有多種胜肽類、酶、生物胺、膽鹼、甘油、磷酸、脂肪酸、脂類、碳水化合物及多種游離胺基酸等(Dotimas and Hider, 1987; Ganldie *et al.*, 1976; Habermann, 1972)。而虎頭蜂蜂毒則以蛋白質酶、胜肽類及一些胺基酸為主。蜂毒組成分會隨季節、地區與蜂體齡期的不同而略有差異；蜂毒除了是蜂類用來抵禦外來侵入者的主要武器外，亦知其具有能抑制細菌(Habermann, 1972; Dotimas and Hider, 1987)、抑制真菌(Hot *et al.*, 2000)以及病毒等微生物生長的抗菌成分。蜂毒中之 melittin 可添加於宿主細胞而成功的抑制人類 HIV-1 病毒之複製(Wachinger *et al.*, 1998)。蜜蜂蜂毒亦被證實於體內外(*in vivo*, *in vitro*)均具腫瘤抑制作用，很有開發治療惡性腫瘤化療藥劑之潛力(Liu *et al.*, 2002)。另外，Moreira *et al.*(2002)將蜜蜂毒質成份 phospholipase A₂ 的基因構築於吸血方能啟動之 promotor 後，並轉殖於瘧蚊 *Anopheles stephensi* 的中腸細胞，如此可以有效阻礙瘧原蟲 *Plasmodium berghei* 之卵囊體(oocyte)於蚊子體內發育(Moreira *et al.*, 2002)。

蜂毒抑菌活性之探討

蜂毒抑菌活性探討採用八個品系細菌進行，其中格蘭氏陰性菌(Gram negative)包括四種動物性病原菌：腸炎弧菌 *Vibrio parahemolyticus*、沙門氏菌 *Salmonella typhimurium*、大腸桿菌 *Escherichia coli* O157:H7、克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumoniae*；及兩種植物性病原菌西瓜細菌性果斑病菌 *Acidovorax avenae*、海芋細菌性軟腐病 *Erwinia carotovora*；格蘭氏陽性菌(Gram positive)則為動物性病原之金黃葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 兩品系 CCRC 15211；CCRC 12652。結果顯示蜜蜂及黃腰虎頭蜂的蜂毒對供試菌株皆具抑制作用(表一)，以 *A. avenae* 及 *E. carotovora* 對蜜蜂蜂毒感受性最高，其最低抑菌濃度(minimum inhibitory concentration, MIC)為 2^{-13} unit/ml，而 *S. typhimurium* 感受性最低 MIC 為 2^{-8} unit/ml，黃腰虎頭蜂則以 *V. parahemolyticus* 感受性最高 MIC $< 2^{-16}$ unit/ml，而 *E. coli* O157:H7 感受性最低 MIC= 2^{-8} unit/ml，由此顯見蜂毒不論對格蘭氏陽性或陰性細菌皆有抗菌活性，於微生物藥理應用上具有開發研究的價值。通常抗菌蛋白帶有許多正電荷，由於格蘭氏陰性細菌外層細胞膜組成分為脂多醣(lipopolysaccharide, LPS)-脂質 A (lipid A)，其分子帶有陰離子，使得細菌外層細胞膜上同樣帶有陰離子，須與兩價陽離子(Ca^{2+} 或 Mg^{2+})結合，細胞膜結構才趨於穩固，但同樣帶陽離子的抗菌蛋白卻更易與細胞膜上之陰離子結合，進而破壞細胞膜穩固的結構(Epand and Vogel, 1999; Hancock, 1997; Hancock and Chapple, 1999; Vaara and Porro, 1996)，一般抗菌蛋白與細胞膜結合後會鑲嵌於膜上，待抗菌蛋白濃度足夠便會造成細胞膜穿孔或磷脂質的被破壞，而進入細胞內，造成細菌的死亡(Oren and Shai, 1998; Wu *et al.*, 1999)；但抗菌蛋白抑制格蘭氏陽性細菌生長的機制目前仍不清楚，一般認為同樣是造成細胞

膜的破壞(Friedrich *et al.*, 2000),如細胞膜組成分肽聚醣(peptidoglycan)內富含的 teichoic acid 因易突變而使細胞膜表面帶陰離子,使其易與帶陽離子的抗菌蛋白結合(Pescher *et al.*, 1999),或使膜表面質子驅動力量或膜上聯結分子消失,造成細菌的死亡。

表一、蜜蜂與黃腰虎頭蜂蜂毒質*對測試細菌之最低抑菌濃度及最低殺菌濃度
Table 1. The minimal inhibitory concentrations (MICs) and minimal bactericidal concentrations (MBCs) of *Apis mellifera* and *Vespa affinis* venom*

Bacteria	MIC (unit/ml)		MBC (unit/ml)	
	<i>Apis mellifera</i>	<i>Vespa affinis</i>	<i>Apis mellifera</i>	<i>Vespa affinis</i>
<i>Vibrio parahemolytic</i> CCRC 10806	2 ⁻¹⁴	< 2 ⁻¹⁶	2 ⁻¹²	2 ⁻¹⁴
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCRE 10694	2 ⁻⁸	2 ⁻¹⁰	2 ⁻⁸	2 ⁻¹⁰
<i>Escherichia coli</i> O157 : H7 CCRC 14824	2 ⁻⁸	2 ⁻⁸	2 ⁻⁸	2 ⁻⁸
<i>Salmonella typhimurium</i> CCRC 12947	2 ⁻⁹	2 ⁻¹⁰	2 ⁻⁷	2 ⁻⁹
<i>Staphylococcus aureus</i> CCRC 15211	2 ⁻¹²	2 ⁻¹³ ~2 ⁻¹⁴	2 ⁻⁸	2 ⁻⁹
<i>Staphylococcus aureus</i> CCRC 12652	2 ⁻¹¹	2 ⁻¹⁴ ~2 ⁻¹⁵	2 ⁻⁸	2 ⁻¹⁰
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>Citrulli</i>	2 ⁻¹³	2 ⁻¹²	2 ⁻¹²	2 ⁻¹²
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>Carotovora</i>	2 ⁻¹²	2 ⁻¹⁰ ~2 ⁻¹¹	2 ⁻¹¹	2 ⁻⁹

**Apis mellifera* and *Vespa affinis* venom were diluted by TSB medium.

表二結果顯示蜂毒抑菌成分對高溫具耐受性,以 100°C 處理 15 分鐘,蜜蜂蜂毒抑菌活性不受影響,而黃腰虎頭蜂蜂毒則僅略受影響;另外以胰蛋白酶進行蜂毒之處理,可有效破壞蜂毒中的抑菌成份,由此結果綜合推論,蜜蜂與黃腰虎頭蜂蜂毒的抑菌成分應為小分子的胜肽類蛋白質,至於蜂毒中有效抑菌成份之分離與純化則有待進一步探討。

將蜜蜂蜂毒與 50 µg/ml 抗生素 Ampicillin 混合後測試 *E. coli* 抗性品系 JM-109 與 BL-21 之菌株具協力抑菌作用;另外蜜蜂蜂毒與 70%酒精亦具協力抑菌效果(表三)。Hof *et al.* (2000)曾以低劑量之胡蜂蜂毒成份 histatin 5 添加於 amphotericin B 中以進行真菌生長抑制測試,得到良好的協

力殺真菌效果。目前因藥物的濫用而導致許多細菌產生嚴重抗藥性，在臨床上有些菌株引起的疾病已面臨無藥可用的窘境，蜂毒與抗生素能具協力殺菌作用，且抗菌蛋白具有不會引起細菌產生抗藥性的優點，若進一步進行一些臨床試驗，或許可解決部分細菌抗藥性的問題。

表二、 比較加熱處理蜜蜂與黃腰虎頭蜂毒質對測試細菌之抑菌活性

Table 2. Antibacterial activity of the venom of *Apis mellifera* and *Vespa affinis* to the bacteria after heat treatment

Bacteria strains	The zone of inhibition (mm)			
	<i>Apis mellifera</i>		<i>Vespa affinis</i>	
	Heated	Non-heated	Heated*	Non-heated
<i>Vibrio parahemolyticus</i> (CCRC 10806)	11.72	12.10	15.96	16.16
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (CCRE 10694)	8.09	9.04	ND	9.65
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (CCRC 14824)	7.39	9.12	8.04	9.46
<i>Salmonella typhimurium</i> (CCRC 12947)	8.57	8.37	ND	10.33
<i>Staphylococcus aureus</i> (CCRC 15211)	9.45	9.46	ND	11.05
<i>Staphylococcus aureus</i> (CCRC 12652)	9.28	9.56	ND	11.24
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>Citrulli</i>	9.19	9.15	ND	14.10
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>Carotovora</i>	8.39	8.83	ND	10.73

*Heated: *Apis mellifera* and *Vespa affinis* venom were heated at 100°C for 15 mins; ND, non detected

表三、不同濃度酒精與蜜蜂毒質*對細菌之抑菌協力作用

Table 3. Synergistic effects of honeybee venom* and ethanol to the bacteria

Bacteria	The zone of inhibition (mm)								Bee venom (MIC)
	30% alcohol		50% alcohol		70% alcohol		99.5% alcohol		
	Alc.+ venom	Alc.	Alc.+ venom	Alc.	Alc.+ venom	Alc.	Alc.+ venom	Alc..	
<i>Vibrio parahamelytics</i>	10.38	-	10.82	10.25	14.91	12.01	15.69	15.31	7.66
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7.14	-	7.59	6.99	8.24	6.93	15.69	14.79	7.58
<i>Escherichia coli</i> O157 : H7	9.37	-	11.71	-	15.65	11.54	14.92	15.63	7.85
<i>Salmonella typhimurium</i>	8.67	-	12.00	-	15.40	10.77	15.52	15.22	6.92
<i>Staphylococcus aureus</i> CCRC 15211	8.27	-	8.20	-	12.38	8.52	12.63	10.59	8.69
<i>Sta. aureus</i> CCRC 12652	10.26	-	11.90	-	16.46	11.08	13.30	14.75	7.91
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	8.82	-	13.79	-	15.57	14.70	12.73	14.32	7.64
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	8.06	-	8.84	8.22	14.72	13.64	14.81	10.45	7.92

*Bee venom was diluted 1/50 by ethanol; -,no antibacterial activity.

表四、蜜蜂與黃腰虎頭蜂毒質*之溶血性測試

Table 4. Hemolytic activity of *Apis mellifera* and *Vespa affinis* venom* to the RBCs

RBC	The zone of hemolysis (mm)	
	<i>Apis mellifera</i>	<i>Vespa affinis</i>
Horse	13.58	13.46
Sheep	9.45	5.83

**Apis mellifera* and *Vespa affinis* venom were diluted 10^{-1} unit/ml by PBS.

蜜蜂毒質溶血性及細胞毒殺作用測試

以綿羊及馬的紅血球測試兩種蜂毒之溶血作用，結果顯示兩種蜂毒均具溶血性(表四)，發現馬的紅血球較綿羊的紅血球對兩種蜂毒的感受性高，此結果與 Berneimer *et al.* (1980)測試之收割蟻蟻毒及 Orivel *et al.* (2001)測試之火蟻蟻毒相符。比較相同紅血球對蜂毒之感受性，結果顯示對蜜蜂蜂毒之感受性較黃腰虎頭蜂毒為高，原因可能是蜜蜂蜂毒中含有較高量的溶血性成份；也可能是不同動物其細胞膜上的磷脂醯膽鹼 phosphatidycholine 的差異或對毒質感受器及結構組成的不同而導致感受的差異，惟有待試驗證實。蜜蜂毒質中具溶血性的成分以 melittin 為主，且與 phospholipase A2 間具有協力作用(Dotimas and Hider, 1987)。

表五、蜜蜂毒質*對 C6/36、BHK-21 及 Sf9 細胞株之細胞毒性

Table5. The cytotoxicity of honeybee venom* to the cells of C6/36, BHK-21 and Sf9

Cell lines	Lysate rate (%)						
	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
C6/36	ND	90.85±1.31	75.87±1.80	55.74±2.55	55.29±4.07	34.38±3.44	16.72±4.37
BHK-21	ND	92.33±3.07	86.65±2.54	0	0	0	0
Sf9	15.07±3.02	5.47±0.52	3.53±1.15	0	0	0	0

*Honeybee venom was diluted by culture mediums; ND, non detected.

測試蜜蜂毒質對哺乳動物細胞株 BHK-21(hamster, *Mesocricetus auratus*)、白線斑蚊細胞株 C6/36(mosquito, *Aedes albopictus*)及秋行軍蟲細胞株 Sf9(armyworm, *Spodoptera frugiperda*)之細胞毒性，以 BHK-21 及 C6/36 細胞的毒質感受性較高(表五)。低劑量蜜蜂蜂毒可能引發細胞凋亡(apoptosis)(Liu *et al.*, 2002)；高劑量蜜蜂毒質處理對細胞傷害最顯著，細胞形狀立刻產生變化，呈圓形膨脹，最後導致細胞死亡，毒質稀釋一千倍可造成約 90%的細胞崩解(lysis)，而 Sf9 細胞感受性最低，一百倍的稀釋毒質僅能造成約 15%細胞崩解，且細胞形狀變化不明顯，Tosteson and Tosteson (1981)認為細胞產生膨脹、聚集等形狀的改變是由於細胞膜對離子或水分滲透性的改變進而導致組成細胞膜的磷脂雙層膜結構不穩定。由以上結果顯示，蜜蜂毒質造成三種細胞株傷害的程度不一，推測毒質對不同細胞之傷害機制或成分可能互異，或者不同細胞其表面組成份不同導致對蜂毒質之感受性不同。Shaposhnikova *et al.* (1997)指出 melittin 對胸腺細胞(thymocytes)具有膜破壞性。蜜蜂毒質組成分中 melittin 可直接作用於膜上，造成細胞膜的穿孔或增加可透性離子通道的形成，使蜂毒的其他成分更易進入細胞膜內造成細胞崩解 (Dawson *et al.*, 1978; Dotimas and Hider, 1987; Habermann, 1972)，而 phospholipase A₂ 則可水解傳遞細胞內與細胞間訊息的磷脂質 phospholipid 與組成細胞膜的磷脂雙層膜，使細胞訊息無法傳遞或造成細胞結構不穩定，進而

導致細胞的崩解 (Lo *et al.*, 1997; Shaposhnikova *et al.*, 1997; Owen and Pfaff, 1995), hyaluronidase 則可破壞連結細胞或組織間隙的 hyaluronic acid (Dotimas and Hider, 1987; Kemeny *et al.*, 1981), 由以上結果推測蜂毒組成成分中造成細胞膜破壞的各種機制間彼此具有協力作用。蜜蜂毒液中的 melittin 會以四個分子為一單位與細胞膜結合, 造成細胞穿孔並導致細胞崩解 (Levin, 1984) 的情形, 顯示其對細胞膜構造的傷害, 將對細胞生長有很大的影響, 其會由於細胞內外離子不平衡、細胞質散逸等原因而破裂死亡。另外, 或許哺乳動物對蜂群有較高的威脅性, 所以蜜蜂毒質演化出對哺乳動物細胞 (如 BHK-21) 具較大傷害性, 而對 Sf 細胞株傷害性較小。而 Sf9 細胞株將來或許可以應用於建立蜂類毒質基因表現系統之細胞。

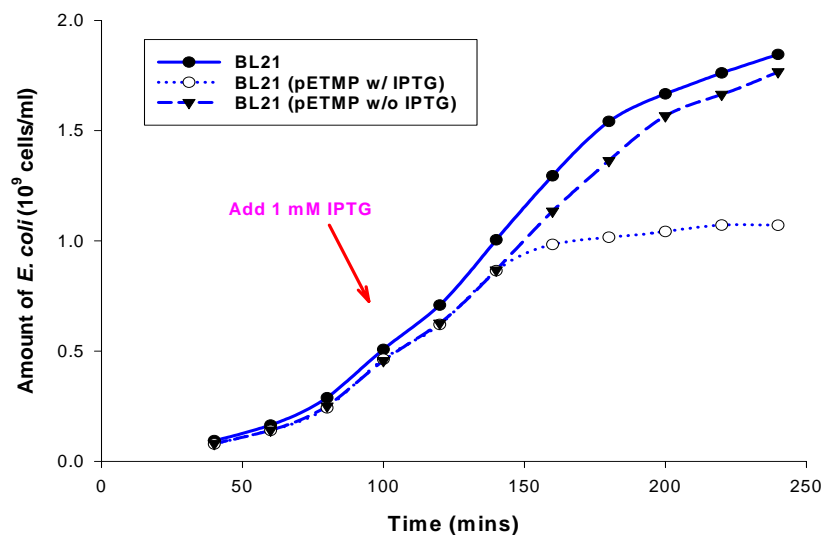
蜂毒 polistes mastoparan cDNA 轉殖及其表現

蜂毒在醫療、藥理上有著多樣性的用途, 然由實際層面而言, 常因能夠取得的蜂群數量不穩定而影響蜂毒產量, 且會因採集者的不同影響蜂毒的品質; 因此若由活體採集分離蜂毒, 所得之蜂毒量常常無法顯現出其經濟效益。因此, 如何有效及大量取得有醫療或抗菌效果之蜂毒質成份成為蜂毒質應用上重要的課題。近年來, 由於生物科技之發達, 許多原本極難取得的蛋白質分子, 藉由微生物表現再大量收集的方式, 使蛋白質的應用得到一線曙光, 胰島素即是一成功的例子。在繁多的微生物中, 大腸桿菌獲得大多數科學研究者的青睞, 究其因乃大腸桿菌表現系統具生長速度快、表現量大及成本低廉等特性。Monsalve *et al.* (1999) 曾將胡蜂 *Vespula vulgaris* 和 *Polistes annularis* 毒液中之 Antigen 5 基因構築於 Bacteria 及 Yeast 中進行表現, 得到不錯的成果。

利用基因轉殖技術量產蜂毒成份以利應用是本實驗室另一重要發展項目, 本實驗採用胡蜂科 (Vaspidae)、馬蜂亞科 (Polistinae)、馬蜂屬 (*Polistes*) 之家馬蜂 (*Polistes jadwigae*) 蜂毒中具抗菌活性之毒質蛋白 polistes mastoparan 的 cDNA 進行基因轉殖與表現之研究。因為 mastoparan 為胡蜂科成員常見之蜂毒成分, 具有典型抗菌蛋白的特性, 如小分子量、陽離子多形成表面帶正電荷之分子 (cationic amphiphilic character)、容易與磷脂構成之膜狀構造結合 (Higashimjima *et al.*, 1983; Chuang *et al.*, 1996; Ho *et al.*, 1998)、具溶血性 (hemolytic activity) (Ho *et al.*, 1996) 及刺激膜上之 G-protein (Chahdi *et al.*, 1998; Klinker *et al.*, 1996) 等。建立此類抗菌勝肽蛋白之基因轉殖表現技術, 有助於蜂毒抗菌蛋白成份之大量表現, 繼而提供穩定之蜂類毒質來源。

根據 *Polistes jadwigae* 之 mastoparan 的氨基酸序列 VDWKKIGQHILSVL, 轉譯成適合大腸桿菌 *E. coli* 表現的遺傳訊息 cDNA 序列為 5'GTGGACTGGAAGAAAATCGGCCAACATATCCTCAGCGTGACT3', 配合在 5'端加上限制酵素 *NdeI* 切位, 利用切位上所含之 ATG 密碼子做為起始密碼子, 並在 3'端加上終止密碼子和限制酵素 *EcoRI* 切位, 將此 cDNA 片段構築於 pET21b 轉殖載體中, 得到重組載體 pETMP, 並將其轉殖 (transformation) 至 BL21 大腸桿菌品系中, 得到含重組載體之大腸桿菌表現宿主。此表現系

統以乳糖類似物(IPTG)調控此外來基因之表現，IPTG 藉調控表現載體上的 lac operon 以調節 polistes mastoparan 的表現。選用 lac operon 的 IPTG 調控表現系統乃因 mastoparan 具抑菌作用，若無調節機制則很容易因基因之表現而殺死宿主細胞得不到產物，所以策略上以大量培養宿主菌體繼而同時進行基因表現之誘發，然後再萃取出抗菌蛋白。



圖一、表現誘導物對含 pETMP 置換載體 BL21 品系大腸桿菌生長之影響

Fig. 1. The influence of expression inducer (IPTG) on BL21 strain of *E. coli* containing pETMP

含重組載體之大腸桿菌表現宿主經由 IPTG 誘導表現後，生長情況明顯與未接受誘導表現之大腸桿菌有所不同(圖一)，在誘導表現後之產物會影響宿主正常的生長；而將不含重組載體之大腸桿菌等量混合於含經誘導表現之大腸桿菌培養液中，顯示混合培養組之生長曲線介於不含重組載體之大腸桿菌與含重組載體並經誘導表現之大腸桿菌之間，其速率約為兩者之平均。由此結果可知儘管經誘導表現之大腸桿菌生長受到抑制，但不影響正常大腸桿菌菌株之生長，亦即表現之產物不能經由分泌方式釋放於培養液。另外，以掃描式電子顯微鏡的觀察誘導表現之大腸桿菌，發現菌體會呈現凹陷或穿孔現象，明顯異於正常菌株之型態，是否此凹陷或穿孔就是 polistes mastoparan 之作用仍待進一步釐清。惟 Li *et al.* (2000)指出 mastoparan M 會造成處理過大腸桿菌之細胞膜及胞壁的破壞，導致表面呈現穿孔現象，其掃描電子顯微鏡圖呈現之形態與本試驗結果相似。

利用細胞擊碎機(cell disruption system)以低溫高壓方式將菌體打破，分別將培養液及菌體萃取物對感性菌株之腸炎弧菌 (*Vibrio parahemolyticus*) 進行抗菌性測試，結果僅誘導表現之大腸桿菌菌體萃取物，對腸炎弧菌具有抑菌效果，再次顯示誘發表現之抑菌成份不會分泌或釋放於細胞外。mastoparan 會與膜狀構造結合的特性 (Higashimjima *et al.*, 1983; Chuang *et al.*, 1996; Ho *et al.*, 1998)，易使產物與胞膜複合在一起，造成無法溶解於水中的情形。Gerhard *et al.* (1996)提到 amphipathic 胜肽或蛋白質與雙層膜構造之間的相互作用，會修飾或活化其某些生理程序，如 pore formation(gating)、融合或訊息傳遞等。根據 Lee *et al.*(2000)的研究中指出，mastoparan M 對革蘭氏陽性菌及陰性菌之生長有抑制作用。Higashimjima *et al.* (1983)亦指出 mastoparan 與疏水性分支鏈群的膜狀構造具結合的特性，會擾亂細胞正常生理代謝，進而改變原本的生長速率。

而從試驗結果可知，利用大腸桿菌表現之產物雖具有對大腸桿菌及腸炎弧菌的抑制效果，惟不易分離純化；雖然 Lee *et al.* (2000)曾以融合蛋白(fusion protein)的方式解決抗菌胜肽與膜系的結合問題，得到大量產物。然找尋不受胜肽類抗菌蛋白影響且適合轉殖表現的其他微生物表現系統亦可為蜂毒基因轉殖的候選者，如經初步測試的酵母菌表現系統(yeast protein secretion system)中 *Pichia pastoris* 及 *Saccharomyces cerevisiae*，這兩者均不受 mastoparan 的影響；另外，核多角體病毒(baculovirus)不具膜狀構造的性質，或許亦可應用於蜂類毒質之表現。

結 語

蜜蜂或胡蜂蜂毒中存有許多具各種生物活性的物質，若有計畫的逐一探討，將來或許在傳統炎症治療用途外，亦可善加開發於微生物病原之醫療用途。

引用文獻

- Alexander, B. A. 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Apis* (Hymenoptera: Apidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 84: 137-149.
- Chahdi, A., L. Daeffler, J. P. Gies, and Y. Landry. 1998. Drugs interacting with G protein α -subunits: selectivity and perspectives. Fundam. Clin. Pharmacol. 12: 121-132.
- Chuang, C. C., W. C. Huang, H. M. Yu, K. T. Wang, and S. H. Wu. 1996. Conformation of *Vespa basalis* mastoparan-B in trifluoroethanol-containing aqueous solution. Biochim. Biophys. Acta 1292: 1-8.
- Dotimas, E. M., and R. C. Hider. 1987. Honeybee venom. Bee world 68: 51-70.
- Engel, M. S. 1998. Fossil honey bees and evolution in the genus *Apis* (Hymenoptera: Apidae). Apidologie 29: 265-281.

- Gauldie, J., J. M. Hanson, F. D. Rumjanek, R. A. Shipolini, and C. A. Verson.** 1976. The peptide components of bee venom. *Eur. J. Biochem.* 61: 369-376.
- Habermann, E.** 1972. Bee and wasp venoms. *Science* 177: 314-322.
- Hemmer, W., M. Focke, D. Kolarich, I. B. Wilson, F. Altmann, S. Wohrl, M. Gotz, and R. Jarisch.** 2001. Antibody binding to venom carbohydrates is a frequent cause for double positivity to honeybee and yellow jacket venom in patients with stinging-insect allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108: 1045-1052.
- Higashimjima, T., K. Wakamatsu, M. Takemitsu, M. Fujino, T. Nakajima, and T. Miyazawa.** 1983. Conformation change of mastoparan from wasp venom on binding with phospholipid membrane. *FEBS Lett.* 152: 1735-1742.
- Hirai, Y., T. Yasuhara, H. Yoshida, T. Nakajima, M. Fujino, and C. Kitada.** 1979. A new mast cell degranulating peptide "mastoparan" in the venom of *Vespula lewissi*. *Chem. Pharm. Bull. (Jpn)* 27: 1942-1944.
- Ho, C. L., W. C. Chen, and Y. L. Lin.** 1998. Structures and biological activities of new wasp venom peptides isolated from the black-bellied hornet (*Vespa basalis*) venom. *Toxicon* 36: 609-617.
- Ho, C. L., Y. L. Lin, W. C. Chen, L. L. Hwang, H. M. Yu, and K. T. Wang.** 1996. Structural requirements for the edema-inducing and hemolytic activities of mastoparan B isolated from the hornet (*Vespa basalis*) venom. *Toxicon* 34: 1027-1035.
- Hof, W., I. M. Reijnders, E. J. Helmerhorst, E. Walgreen-Weterings, I. M. Simoons-Smit, E. C. I. Veerman, and A. V. N. Amerongen.** 2000. Synergistic effects of low doses of histatin 5 and its analogues on amphotericin B anti-mycotic activity. *Antonie van Leeuwenhoek* 78: 163-169.
- Kang, S. S., S. C. Pak, and S. H. Choi.** 2002. The effect of whole bee venom on arthritis. *Am. J. Chin. Med.* 30: 73-80.
- Klinker, J. F., K. L. Laugwitz, A. Hagelucken, and R. Seifert.** 1996. Activation of GTP formation and high-affinity GTP hydrolysis by mastoparan in various cell membranes. *Biochem. Pharmacol.* 51: 217-223.
- Konno, K., M. S. Palma, I. Y. Hitara, M. A. Juliano, L. Juliano, and T. Yasuhara.** 2002. Identification of bradykinins in solitary wasp venoms. *Toxicon* 40: 309-312.
- Kornberg, A., S. Kaufman, L. Silber, and J. S. Ishay.** 1988. Effect of venom sac extract of the oriental hornet (*Vespa orientalis*) on coagulation factors. *Toxicon* 26: 1169-1176.
- Krochmal, C.** 1994. Bee venom therapy: Research lends support to ancient folk medicine. *Am. Bee. J.* 134: 822-823.

- Kwon, Y. B., H. J. Lee, H. J. Han, W. C. Mar, S. K. Kang, O. B. Yoon, A. J. Beitz, and J. H. Lee.** 2002. The water-soluble fraction of bee venom produces antinociceptive and anti-inflammatory effects on rheumatoid arthritis in rats. *Life Sci.* 71: 191-204.
- Lariviere, W. R., and R. Melzack.** 1996. The bee venom test: a new tonic-pain test. *Pain* 66: 271-277.
- Lee, J. H., J. H. Kim, S. W. Hwang, W. J. Lee, H. K. Yoon, H. S. Lee, and S. S. Hong.** 2000. High-level expression of antimicrobial peptide mediated by a fusion partner reinforcing formation of inclusion bodies. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 277: 575-580.
- Li, M. L., R. W. Liao, J. W. Qiu, Z. J. Wang, and T. M. Wu.** 2000. Antimicrobial activity of synthetic all-D mastoparan M. *Int. J. Antimicrob. Agents* 13: 203-208.
- Liu X, Chen D, Xie L, Zhang R.** 2002. Effect of honey bee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cells in-vitro and growth of murine B16 melanomas in-vivo.
- Marz, C.** 1993. Bee venom therapy for multiple sclerosis. *Am Bee. J.* 133: 192.
- Monsalve, R. I., G. Lu, and T. P. King.** 1999. Expressions of recombinant venom allergen, antigen 5 of yellowjacket (*Vespula vulgaris*) and paper wasp (*Polistes annularis*), in bacteria or yeast. *Protein Express. Purif.* 16: 410-416.
- Moreira, L. A., J. Ito, A. Ghosh, M. Devenport, H. Zieler, E. G. Abraham, A. Crisanti, T. Nolan, F. Catteruccia, and M. Jacobs-Lorena.** 2002. Bee venom phospholipase inhibits malaria parasite development in transgenic mosquitoes. *J. Biol. Chem.* 277: 40839-40843.
- Orivel, J., V. Redeker, J. P. Le Caer, F. Krier, A. M. Revol-Junelles, A. Longeon, A. Chaffotte, A. Dejean, and J. Rossier.** 2001. Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides from the venom of the ant *Pachycondyla goeldii*. *J. Biol. Chem.* 276: 17823-17829.
- Pursley, R. E.** 1973. Stinging Hymenoptera. *Am. Bee J.* 113: 131-135.
- Rivers, D. B., W. F. Hink, and D. L. Denlinger.** 1993. Toxicity of the venom from *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae) toward fly hosts, nontarget insects, different developmental stages, and cultured insect cells. *Toxicon* 31: 755-765.
- Schmidt, J. O.** 1995. Toxinology of venoms from the honeybee genus *Apis*. *Toxicon* 33: 917-927.
- Schmidt, J. O., T. S. Lee, and J. T. Chao.** 1993. Pharmacological activities of *Polistes rothneyi grahami* and *P. olivaceus* (Hymenoptera: Vespoidea) venoms, a preliminary report. *Chinese J. Entomol.* 13: 259-263.
- Shaposhnikova, V. V., M. V. Egorova, A. A. Kudryavtsev, M. Kh. Levitman, and Yu. N. Korystov.** 1997. The effect of melittin on proliferation and death of thymocytes. *FEBS Letters* 410: 285-288.
- Shipolini, R. A.** 1984. Biochemistry of bee venom. In "Insect poisons, allergens, and other

invertebrate venoms.” (Edited by Anthony T. Tu) pp.49-85. Marcel Dekker, Inc. New York.

Tomalski, M. D., T. P. King, and L. K. Miller. 1993. Expression of hornet genes encoding venom allergen Antigen in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 22: 303-313.

Wachinger, M., A. Kleinschmidt, D. Winder, N. Pechmann, A. Ludvigsen, M. Neumann, R. Holle, B. Salmons, V. Erfle, and R. Brack-Werner. 1998. Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression. *J. Grn. Virol.* 79: 731-740.

Wilkinson, S. 1995. Bee venom-cure for arthritis? The controversy continues. *Am. Bee J.* 135: 492-493.

The Bioactivity and cDNA Expression of Hymenopteran Venom

Tu, Wu-Chun*, Cheng- Peng Chang, and Mars J. Yang

Department of Entomology, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.

ABSTRACT

The hemolytic and antibacterial activity of the venoms of honey bee, *Apis mellifera*, and wasp, *Vespa affinis*, were recorded. The color of venoms of both species are clear yellow, and their pH are 5.5 and 6.0 to 6.5 for *A. mellifera* and *V. affinis*, respectively.

Antibacterial activities of *A. mellifera* crude venom were tested against 7 species of animal or plant pathogenic bacteria, which include *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahemolyticus*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* CCRC 15211, *Staphylococcus aureus* CCRC 12652, *Acidovorax avenae*, and *Erwinia carotovora*. The results indicated that all bacteria are sensitive to the crude venom, and the minimum inhibition concentration (MIC) ranged from 2^{-8} to 2^{-12} unit/ml. Heat treatment at 100°C for 15 min did not affect the antibacterial activity of venom suggested that the effective components of the venom may be peptides. Synergistic effects of the low dose of bee venom occurred with 70% alcohol or antibiotics.

The recombinant DNA expression system of *Escherichia coli* was established in the wasp venom expression. cDNA of polistes mastoparan (polistes MP), a venom component of *Polistes jadwigae* wasp was constructed into pET21b vector as pETMP plasmid, and then transformed the pETMP plasmid into the BL21(DE3) strain of *E. coli*. The polistes MP expression was regulated by isopropyl-1-thio- β -D-galactoside (IPTG). After IPTG treatment, the growth of host *E. coli* was inhibited and the surface of *E. coli* showed abnormal dents or perforation, but the growth inhibition was discontinued after 4 hours. The induced product of pETMP showed antibacterial activity to the bacteria, *Vibrio parahemolyticus*.

The use of bee or wasp venom is very common in traditional medicinal practices, especially for rheumatism and arthritis. Our primitive observation has clearly demonstrated the antimicrobial properties do exist in the venom, but the impacts and potential of these venoms in future application need to be further studied.