

改良型抗菌肽的研究进展*

朱鑫 马清泉 董娜 单安山**

(东北农业大学动物营养研究所, 哈尔滨 150030)

摘要 长期滥用抗生素导致了耐药菌株“超级细菌”的出现, 增加了动物、人类健康和环境污染风险。寻找抗生素替代品正成为全球研究热点, 抗菌肽因其高效抗菌效果和不同于抗生素的独特作用机制引起了各国研究者的关注, 并进行了相关研究。然而抗菌肽的安全性、稳定性、生产成本等问题限制了其生产与应用。为了克服这些不利因素, 研究者们对抗菌肽进行了多种方式的改造, 产生了模拟型、同源型、杂合型、铎合型、稳定型和固位型等改良型抗菌肽, 并有望在畜牧业、食品业、医药业等领域得到广泛的应用。本文主要综述了这些改良型抗菌肽近年来的研究进展。

关键词 抗菌肽, 分子改造, 饲料, 畜牧, 医药

学科分类号 Q518

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00544

2010年出现的“超级细菌”NDM-1事件再一次将滥用抗生素引发的日益严重的耐药菌株等问题摆在了公众的面前, 而长期过量滥用抗生素所引起的食品安全、人类健康、环境污染等问题也受到了公众的广泛关注。政府管理部门加大了对抗生素审查的力度, 这些均使得抗生素的研发与应用遇到了前所未有的瓶颈期。然而, 人们对抗菌类药物的需求却并未减少, 反而更为强烈^[1]。因此, 寻找抗生素的替代品成为当务之急。

抗菌肽是自然界生物有机体防御体系中重要的组成部分, 具有分子质量小(< 10 ku), 阳离子性和两亲性等特点。在过去的20多年里, 人们已经从细菌、真菌、植物、动物中分离出了多种抗菌肽, 这些抗菌肽表现出了对细菌、原虫、真菌、病毒等广谱抗性和对肿瘤细胞等细胞毒性^[2]。抗菌肽主要作用于微生物细胞膜, 使细胞膜穿孔, 破坏细胞膜的完整性, 导致细胞质外溢而达到杀菌的目的, 这与抗生素的作用机制不同, 因此微生物不易产生耐药性^[3]。基于以上特点, 抗菌肽正成为最有前景的抗生素替代品, 有望在畜牧养殖业、饲料业、食品业、医药业等领域得到广泛应用。

尽管具有以上的优点, 但是将目前的抗菌肽研究成果应用到生产实践中, 可能还要面临诸多挑

战。首先是抗菌肽的安全性问题。许多天然抗菌肽具有溶血特性以及细胞毒性, 因而限制了其在动物和人体上的应用。尽管出现微生物对抗菌肽产生耐药性的几率不大, 但我们在使用抗菌肽时也应进行严格的观察和控制, 以避免类似抗生素耐药性的出现。其次是抗菌肽的稳定性问题。抗菌肽是由自然界存在的各种氨基酸构成, 其本质仍是蛋白质, 因此无论是经口服还是注射, 抗菌肽进入体内均面临着被蛋白酶降解的可能, 或是与某些其他物质结合, 最终导致活性降低或丧失。目前对抗菌肽的药效及其动力学研究还比较少, 在生产、贮存、运输等环节如何保持抗菌肽活性仍是一个亟待解决的问题。最后也是最重要的是抗菌肽的生产成本问题。天然生物有机体中抗菌肽含量非常低, 提取步骤繁琐、效率低下、且工艺要求高。通过基因工程方法在基因工程菌中直接表达抗菌肽基因, 不仅易被酶降解, 而且表达产物易对宿主产生毒性, 影响其高

* 国家自然科学基金(31072046)和黑龙江省教育厅(11551z003)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0451-55190685, E-mail: asshan@mail.neau.edu.cn

收稿日期: 2011-11-23, 接受日期: 2012-02-20

效表达。因此在未来相当长的时间内,如何提高抗菌肽产量,降低生产成本是抗菌肽在生产实践中应用的主要障碍^[4]。

为了解决以上问题,人们进行了不懈的努力。而目前人们对抗菌肽的研究主要集中在两个方面:一是继续鉴别自然界天然存在的抗菌肽,确定抗菌范围、研究作用机制、评估细胞毒性等;二是重新设计、对已存在的抗菌肽进行改进,形成具有独特性质的改良型抗菌肽(modified antimicrobial peptides)^[5],本文主要就改良型抗菌肽近年来的研究进展进行综述。

1 模拟型抗菌肽

模拟型抗菌肽(antimicrobial peptide mimetics)是指根据天然存在的抗菌肽序列、结构和功能模拟出来的人造非肽类分子,其主干链并不仅仅由 α -氨基酸构成。模拟天然抗菌肽一级结构的化合物主要是树状聚合物(dendrimers)、 β -肽(β -peptides)和类肽(peptoids)。树状聚合物主要通过端基阳离子官能团和疏水性支链骨架起作用的,树状聚合物表面阳离子的高集中浓缩有助于提高抗菌活性,同时,疏水性支链的空间位阻可限制肽酶对肽键的降解速率,从而提高树状聚合物的耐酶降解能力^[6]。 β -肽可以形成螺旋、折叠、转角等结构,同时具有较高的抗酶降解能力和较低的细胞毒性^[7]。类肽可以阻止肽主干链手性以及链内氢键形成,可形成螺旋结构,具有广谱抗菌性和低溶血性^[7]。模拟天然抗菌肽二级结构的化合物主要是蛋白质表位模拟物。目前模拟成功的二级结构主要是 α -螺旋、 β -折叠、 β -发卡、 β -转角、loop等结构^[8]。模拟天然抗菌肽阳离子性和疏水性特征的化合物主要是类固醇-胺共价物和寡酰基赖氨酰低聚体(oligoacyllysines, OAKs)。类固醇与胺类形成的共价化合物具有阳离子的特性,通过静电吸引与带负电荷的微生物膜作用发挥抗菌性能,同时具有耐酸、抗酶降解的优势^[9]。寡酰基赖氨酰低聚体的疏水性是通过调控酰基链的长度实现的^[9]。模拟天然抗菌肽两亲性空间构象的化合物主要是苯酰胺低聚体(arylamide oligomers)、苯乙炔低聚体(phenylene ethynyls oligomers)、随机序列共聚物。苯酰胺低聚体具有广谱抗菌性,且构象的稳定有助于提高抗菌性和选择性^[7]。苯乙炔低聚体主要通过孔形成机制发挥抗菌性能^[7]。随机序列共聚物在构象上形成不规则的结构,在整体上形成两亲性特征,从而发挥抗菌性

能^[6]。

影响模拟型抗菌肽的因素主要有两亲性平衡、阳离子性、分子质量等。优化两亲性平衡主要是通过调节阳离子基团与疏水性基团的种类和比例实现的^[10]。铵基团和胍基团是模拟型抗菌肽主要的阳离子来源,且阳离子基团的数量、密度、空间排布等都会影响模拟型抗菌肽的抗菌性和细胞毒性^[11]。与高分子质量聚合物相比,低分子质量聚合物可以产生非溶血特性的抗菌肽^[10]。

除具有抗菌活性外,模拟型抗菌肽也是研究细菌膜去极化、膜孔形成等抑菌机制理想的材料^[12]。因此,模拟包含有更加复杂的多肽链和多重二级结构类型的抗菌肽成为未来研究开发的挑战。同时,由于模拟型抗菌肽具有生产成本低、合成量大、化学结构多样等优势,有望在生物医学、制药、医疗、食品等领域发挥重要作用。

2 同源型抗菌肽

同源型抗菌肽(antimicrobial peptide congeners)是指与天然抗菌肽或母肽在组成上极其相关的一类肽,起着相似或拮抗作用。获得同源型抗菌肽的方法主要包括二硫键的删除、氨基酸残基的替换、氨基酸序列的删减、氨基酸手性的改变等。这些手段也是研究抗菌肽保守氨基酸序列、保守区域、结构与功能关系等最主要的方法。

删除二硫键是获得同源型抗菌肽一种非常有效的方法。 β -防御素(β -defensins)有3个分子内二硫键,二硫键的存在不仅有助于三级结构的稳定,而且在结合和活化细胞受体方面也起着关键的作用^[13]。二硫键的存在或分布方式对抗菌活性的影响是根据不同的肽而有所不同^[14]。如删除分子内二硫键,人 β -defensin 1的抗菌活性会提高^[15],人 β -defensin 2的抗菌活性会降低^[16],而人 β -defensin 3的抗菌活性则没有显著改变^[17]。替换母肽某些特定氨基酸是发现和研究抗菌肽保守氨基酸及其功能的重要手段。如靠近 α -螺旋核心区的甘氨酸(Gly)有助于提高结构的灵活性,同时降低细胞毒性,增加芳香族氨基酸(如Trp)和疏水性氨基酸(如Leu)含量可提高抗菌活性^[18-19];富含精氨酸(Arg)的抗菌肽还可以作为胞内蛋白质转运的潜在载体^[20];富含组氨酸(His)的抗菌肽能与DNA形成复合体以实现基因转移等^[21]。置换和/或截短母肽特定氨基酸序列是设计抗菌肽、研究抗菌肽与细胞膜相互作用及影响因素等常用的方法。如删除人 β -defensins-3(HBD3)的N

端区域则显著提高其抗菌活性^[22]。用猪胃蛋白酶消化牛血红蛋白得到最短抗菌肽 KYR^[23], 而另一个最小抗菌肽序列 FEG 则来源于鼠唾液腺激素原 SMR1 的 C 端^[24]。与 L-型 AA 构成的抗菌肽比, D-型抗菌肽具有较高的抗蛋白酶降解能力, 且在 NaCl, MgCl₂ 和血清存在条件下, D-型抗菌肽抗菌活性比 L-型高^[25]。

对抗菌肽进行其他方面的修饰也会形成同源型抗菌肽。通过对抗菌肽末端进行疏水性氨基酸标记, 得到的抗菌肽与原抗菌肽相比, 其抗菌活性和稳定性均有所提高。且在高电解质溶液以及有血浆存在的条件下, 随着标记长度的增加, 抗菌肽结合微生物膜的能力显著加强^[26-27]。将单分子抗菌肽经低聚化形成的二聚体可提高抗菌肽的生物活性。含有半胱氨酸(Cys)的 α -螺旋二聚体的抗菌活性比单体抗菌肽高 16 倍以上^[28]。 β -转角抗菌肽 PST13-RK 经二聚化形成的抗菌肽可提高抗癌活性^[29]。

尽管普遍认为细菌对抗菌肽出现耐药性的几率不大, 但是认为不可能出现这种耐药性的想法也是不切实际的。在培养有 *E.coli* 和 *Pseudomonas fluorescens* 的培养基中加入 pexiganan (一种 magainin 的同源肽), 结果经过连续几代培养, 对该抗菌肽具有抵抗力的菌株就出现了^[30]。若是微生物改变膜能量或经诱导产生蛋白质水解体系等, 这就有可能产生对抗菌肽的耐药性^[31]。因此, 对同源型抗菌肽的研究不仅可以弄清楚抗菌肽的作用机制, 而且在如何有远见地以及正确地使用抗菌肽, 防止出现类似抗生素耐药性问题等方面也有重要的研究意义。

在设计及研究抗菌肽作用机制时, 阐明抗菌肽的物理化学特性与活性之间的关系是非常重要的, 这些物理化学特性主要包括氨基酸序列及长度、构象、疏水性、螺旋性、净正电荷、疏水力矩、极角等。前人关于这方面的研究比较多, 例如螺旋性取决于环境温度和疏水状况; 电荷数的增加有助于抗菌肽在膜外表面的聚集; 疏水性的增加则有助于抗菌肽与膜的相互作用等^[2, 32]。对新发现和已存在的天然抗菌肽进行同源型改造仍将是以后研究抗菌肽结构与功能关系所采用的主要方法。

3 杂合型抗菌肽

抗菌肽与线性肽功能域连接形成的抗菌肽称为杂合型抗菌肽(hybrid antimicrobial peptides), 其结构组成模式为抗菌肽 - 连接体 - 功能域。当功能域

也为抗菌肽时, 其结构组成模式为抗菌肽 - 连接体 - 抗菌肽, 该类肽主要是由 2 个天然抗菌肽的活性区域构成, 从而获得并发挥单个抗菌肽的潜在优势, 且杂合肽分子中间区域常形成铰链区, 充当连接体功能。设计这一类抗菌肽的目的是为了提高抗菌活性, 降低对宿主细胞的毒性。构建该类抗菌肽主要有两种方法: 一种是通过化学合成直接构建出所期望的抗菌肽, 另一种是在适合的重组体系中进行融合蛋白表达^[3]。化学合成法主要包括固相合成法和液相合成法, 而目前抗菌肽的合成多采用固相合成法。如通常将 cecropin A 的 N 端阳离子型 α -螺旋结构与 melittin 或 magainin 2 的 N 端 α -螺旋疏水区相结合, 形成杂合抗菌肽 CA-ME 或 CA-MA。CA(1~8)-ME(1~18)是由 cecropin A 1~8 位氨基酸残基和 melittin 1~18 位氨基酸残基构成^[33]; CA(1~8)-MA(1~12)则是由 cecropin A 1~8 位氨基酸残基和 magainin 2 1~12 位氨基酸残基构成^[34]。这一类抗菌肽在一定的生理盐水浓度变化范围内, 均保持了抗菌活性, 并且能与脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和脂膜酸(lipoteichoic acid, LTA)结合, 提高对细胞膜的渗透性^[35]。然而, 该类抗菌肽均有不同程度的细胞毒性, 研究表明, 杂合肽铰链区的可变性、 α -螺旋含量、两亲性等是影响该类肽细胞毒性的重要因素^[36]。中心铰链区(Gly-Ile-Gly)决定着杂合肽是否有足够的构象可变性, 从而使得阳离子型 N 端 α -螺旋与细胞膜平行排列且与细胞膜相互作用, 同时, 亲水性的 C 端 α -螺旋插入细胞膜且进行扩张, 从而引起细胞溶解。因此, Gly-Ile-Gly 铰链区的缺失将导致杂合肽溶解细胞活性显著下降。除具有抗菌活性外, 杂合肽 P18(cecropin A 阳离子 N 端 -magainin 2 两亲性 C 端)具有抗黑色素瘤功能^[37]。与化学合成法相比, 重组表达法在降低抗菌肽生产成本方面具有明显的优势。重组表达法主要包括原核表达法和真核表达法。如 Cecropin 和人溶菌酶经大肠杆菌表达系统生成的杂合肽 Mdc-hly 比单体 Cecropin 和人溶菌酶具有更高的抗菌活性与抗菌范围^[38]。大肠杆菌表达系统产生的杂合肽 CA(1~8)-ME(1~18)与化学合成的 CA(1~8)-ME(1~18)具有相同的氨基酸序列和抗菌活性^[39]。杂合肽 CA(1~8)-MA(1~12)在毕赤酵母系统的表达量比大肠杆菌系统的表达量要高^[40-41]。

当杂合肽的线性肽功能域作为识别某种特定病原菌时, 该类肽的组成模式为抗菌肽 - 连接体 - 靶

向体. 抗菌肽起着杀灭微生物的作用, 而靶向体则起着识别特定微生物的作用, 这样就形成了对特定微生物具有杀灭作用的特异性靶向抗菌肽(specifically targeted antimicrobial peptides, STAMPs)^[42]. 构建该种形式的杂合肽主要是将抗菌肽与致病性细菌信息素末端的氨基酸序列相连接, 从而与信息素感受器结合, 达到破坏细胞膜、杀灭特定微生物的作用^[43]. 当致病性微生物不止一种时, 可以将针对各种致病性微生物的靶向体与抗菌肽连接, 形成多目标特异性靶向抗菌肽(multiple-headed STAMP, MH-STAMP)^[42]. 在多种类微生物共栖环境下, 该类肽可同时特异性杀灭多种有害微生物, 而不杀灭有益微生物, 这在维持动物胃肠道健康方面可能具有重要的意义.

4 轭合型抗菌肽

轭合型抗菌肽(antimicrobial peptide conjugates)的组成模式也是抗菌肽 - 连接体 - 功能域, 与杂合型抗菌肽的区别在于其功能域为非线性肽或非肽类分子, 即杂合型抗菌肽具有同质性, 轭合型抗菌肽具有异质性. 目前研究的轭合型抗菌肽的功能域主要有抗体、抗原、抗生素、脂肪酸、金属离子等.

Franzman 等^[44]研究了抗菌肽 SMAP-28 与 *Porphyromonas gingivalis* 菌株外表面特异性抗体 IgG 经马来酰亚胺连接体连接形成的轭合物的抗菌活性, 结果表明, 在一个含有 *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 和 *Peptostreptococcus micros* 的人工模拟微生物群落中, 在低浓度条件下(20 mg/L), 该轭合物可选择性地杀灭 *P. gingivalis*, 而不杀灭其他菌株. 而在高浓度条件下(50 mg/L), 该轭合物可杀灭全部所试细菌.

抗菌肽可以作为抗原的佐剂, 与抗原形成轭合物, 进而有效地提高适应性免疫反应. An 等^[45]将编码巨噬细胞集落刺激因子受体(M-CSFR₁₆₋₁)与抗菌肽 LL-37 基因进行融合表达, 所产生的融合疫苗可以有效地诱导产生体液和细胞毒性免疫反应, 延长经 SP2/0-CSFR₁₆₋₁ 肿瘤细胞攻击后小鼠的存活时间, 刺激脾细胞 IFN- γ 和 IL-4 的释放.

Bera 等^[46]研究了富含赖氨酸(Lys)肽与新霉素 B (一种抗生素)连接所形成的轭合物的抗菌活性, 结果表明, 与新霉素和肽相比, 轭合物对甲氧西林抗药性 *S. aureus* 的抗菌活性提高了 8 倍, 但是对其他革兰氏阳性菌抗菌活性下降. 与新霉素相比, 轭

合物对革兰氏阴性菌 *Pseudomonas aeruginosa* 的抗菌活性提高了 4~8 倍, 与肽相比则提高了 12 倍. 设计该类型轭合物的目的是为了将抗生素的作用机制结合给抗菌肽, 提高轭合物的抗菌性能. 而且, 该类轭合物分子的总两亲性可能在抗菌活性方面起着更为重要的作用.

抗菌肽可以与脂肪酸连接形成轭合物, 从而表现出抗菌活性. Chu-Kung 等^[47]研究表明, 抗菌肽 AKK 与脂肪酸连接形成的轭合物均具有抗菌活性, 且脂肪酸链碳原子长度 ≤ 16 时, 抗菌活性随着脂肪酸链长度的增加而提高. 而抗菌肽 LKK 与月桂酸形成的轭合物没有抗菌活性. 该类轭合物的作用机制可能是脂肪酸将其疏水性传递给抗菌肽, 增加了抗菌肽与膜的亲和性, 从而提高了抗菌活性.

抗菌肽与有机金属离子连接形成的轭合物具有较强的抗癌活性. Hu 等^[48]将环戊二烯碳酸锰(CpMn(CO)₃)与抗菌肽 sC18 连接, 形成的轭合物对人乳腺癌细胞 MCF-7 和结肠癌细胞 HT-29 均具有较强的细胞毒性, 且连接体由亚甲基改为酮基时, 细胞毒性进一步增强, 但将锰原子改为铈原子时, 其细胞毒性没有明显改变.

设计杂合型抗菌肽与轭合型抗菌肽要合理地调控抗菌肽的高效性、功能域的选择性和连接体的灵活性^[49], 使其形成的抗菌肽具有高效性、特异性等优点, 成为理想的抗生素替代品.

5 稳定型抗菌肽

稳定型抗菌肽(stabilized antimicrobial peptides), 即环型肽(Cyclotides), 是由一个头尾相连的环型骨架构成, 大约含有 30 个左右氨基酸残基, 并伴有 3 个保守二硫键的小分子环肽^[50]. 目前发现的环型肽主要分布在茜草科(Rubiaceae), 堇菜科(Violaceae), 葫芦科(Cucurbitaceae)等植物中, 主要分为 3 个家族: Möbius, bracelet 和胰蛋白酶抑制剂, 且均是由核糖体生物合成前体蛋白后经环化而得^[51].

自 1995 年环型肽 kalata B1 的结构被提出以来, 人们对环型肽结构的研究进行了不懈地努力^[52]. 目前核磁共振技术(NMR)仍是研究环型肽结构应用最广泛的技术^[51, 53]. 影响环型肽结构完整性的因素主要有环型骨架、半胱氨酸结、二级结构、氢键等^[51]. 尽管在体外或体内将肽折叠成环型结构时环型骨架不是一个必要的条件, 但是在维持环型肽的结构和活性的稳定性方面起着重要的作用^[51]. 环型

肽分子中 6 个 Cys 形成了 3 个二硫键(Cys¹-Cys⁴, Cys²-Cys⁵ 和 Cys³-Cys⁶), 这些二硫键形成了一个半胱氨酸结, 与环型骨架共同形成了环型半胱氨酸结(CCK)结构, 这使得环型肽结构非常稳定, 这主要体现在耐热、耐蛋白酶降解上^[54]. Loop 1 和 loop 4 的保守区构成了 CCK 结构的中心核部分, loop 3 中的螺旋结构是区分 Möbius 家族和 bracelet 家族重要的依据^[55]. Loop 结构中除了极个别氨基酸残基外(如 loop 1 中的 Glu 残基; loop 6 中的 Asn 和 Asp 残基), 当置换非半胱氨酸残基时, 环型肽的生物学功能并没有显著地改变, 这一特性使得环型肽成为非常有前景的肽设计模型骨架或组合模板^[56]. 此外, β - 折叠也是环型肽分子中常见的二级结构, 氢键在维持环型肽骨架稳定方面也起着重要的作用^[51].

与线性肽相比, 环型肽表现出较强的抗菌性和稳定性, 较弱的溶血性和细胞毒性. 尽管大部分环型肽 HD_{50} 值 $>10 \mu\text{mol/L}$, 但是与 melittin 相比, 环型肽溶血活性均比较低, 且通过对环型肽类似物的研究表明, 主链骨架的稳定性是维持较低溶血活性的关键^[57]. 此外, 环型肽还具有促进子宫收缩、抗 HIV、杀虫、驱虫等活性^[56, 58]. 除了天然活性外, CCK 结构也提供了一种模型支架, 可将具有特定生物活性的线性肽序列移植到 CCK 支架上, 从而稳定其生物活性, 并且将这种联合活性转运到生物靶点上发挥作用^[54].

与目前广泛研究的抗菌肽不同, 环型抗菌肽并不具有较强的正电荷特性, 因此人们对环型肽的作用机制进行了相关研究, 这些结果主要形成了以下几点共识: a. 环型肽可以与膜结合; b. 环型肽疏水面与膜结合面位于同一部位; c. 生物活性面与疏水结合面位于不同部位; d. 环型肽是通过在囊泡膜上形成孔起作用的^[57]. 然而, 还有许多问题需要解决, 如不同环型肽的疏水面位于不同表面区域, 其是否具有相同的作用机制还有待于确定, 环型肽对某些脂质具有选择性的原因还不清楚, 环型骨架闭合机制还有待进一步研究等^[58].

6 固位型抗菌肽

在过去的几十年里, 人们一直不断地研究具有抗菌性能的生物材料. 目前主要进行 4 个方面的研究: a. 开发防污材料(材料表面可避免蛋白质的吸收和细胞附着); b. 开发只附着无害致病性细菌的材料; c. 开发与灭杀生物物质相结合的材料; d.

开发与抗生素相结合的材料^[59]. 然而, 由于细菌种类的不同, 防污材料的抗菌效果不是很理想. 与抗生素结合材料的抗菌效果取决于所选择的抗生素种类, 且易于产生耐药性. 抗菌肽的出现弥补了这一不足, 抗菌肽具有广谱抗菌性、不易产生耐药性、稳定、且细胞毒性小等特点, 使得开发这一类生物材料具有广阔的前景.

抗菌肽可以通过物理和化学的方法固定在载体上, 形成固位型抗菌肽(immobilized antimicrobial peptides). 在物理方法中, 多聚膜复层组合技术是普遍受欢迎的方法^[60]. 一个或多个抗菌肽可以像三明治一样被夹在两个多离子聚合物间, 并且聚合物的数目可以灵活控制. 然而, 这种方法却有一个致命的缺点, 那就是被夹在多离子聚合物间的抗菌肽不能有效地通过扩散被释放出来^[61]. 未来研究这一类型抗菌肽主要从三方面着手: a. 降低影响扩散的因素, 如载体类型、扩散途径、聚合物数目、抗菌肽与多聚物相互作用等; b. 避免聚合物外表面结合的细菌阻止载体内部抗菌肽的向外释放; c. 确保抗菌肽的长期稳定性^[62-63].

化学共价结合方法不仅可以降低抗菌肽的毒性, 而且可以增加抗菌肽的长期稳定性, 从而克服物理方法中的某些缺点. 目前研究的共价结合的抗菌肽主要是 Maginin, Melimine, LL37 等^[64]. 除了结合的抗菌肽种类外, 固位后抗菌肽的二级结构、定向、密度、活性序列与固体载体间的长度、易变性、间隔区类型、周围环境等均会影响其生物学效价^[59]. 有试验表明, 靠近 N 端的疏水性残基是固位型抗菌肽具有抗菌活性的关键. 而且, 在抗菌性方面, 较长的间隔区以及固定链的位置要比肽表面密度更重要一些^[63].

天然抗菌肽与微生物膜有高度的亲和性, 根据不同的作用机制达到抗菌效果. 若是被适当地固定住, 固位型抗菌肽似乎也是通过相似的作用机制达到抗菌作用的, 不过, 抗菌能力有稍微的下降, 但抗菌谱不变^[65]. 吸附在材料表面附近的抗菌肽是通过静电作用吸引临近的细菌, 与微生物膜相互作用达到抗菌效果.

因为固位型抗菌肽具有低细胞毒性以及长期稳定性等优点, 所以这方面的研究成果将有非常巨大的应用前景^[66]. 例如在吸附有 nisin 的 PET 瓶里的脱脂乳在冷藏 24 天后, 微生物数量显著降低. 此外在食品保鲜、微生物检测、防金属生锈、防微生物定殖等方面均有重要的作用^[59, 61].

7 其 他

在开发抗菌肽方面并不局限于上面提到的某一种方式, 可以将几种方式相结合. 将抗菌肽 drosocin 的 N 端与 prrhocoricin 的 C 端连接, 然后用非天然氨基酸 1- 氨基 -1- 环己烷羧酸取代缬氨酸 (Val), 经二聚化后连接到非天然氨基酸 2, 4- 二氨基丁酸上, 通过这种方式形成了一种嵌合型抗菌肽 (chimeric antimicrobial peptides), 该肽 A3-APO 不仅可以瓦解微生物膜, 而且可以抑制 70 ku 热应激蛋白 DnaK 的生成^[67]. 通过将氨基酸替换以及序列倒置等方式产生的一系列 A3-APO 类似物均具有较高的抗菌活性, 且与抗生素连用具有协同作用^[68].

8 结 语

抗菌肽因抗菌谱广、抗菌活性强以及不同于抗生素的作用机制等特点使其成为最有希望的抗生素替代品. 然而抗菌肽的稳定性、安全性、生产成本等问题限制其发展与应用. 真正将抗菌肽的研究成果从实验室推向市场并转化成产业, 可能还要面临诸多挑战. 为了克服这些不利因素, 各国研究者探究出不同的途径和方法对抗菌肽进行改造, 产生了模拟型、同源型、杂合型、轭合性、稳定型、固位型等多种类型的改良型抗菌肽, 并有望成为下一代抗菌肽的研究方向.

参 考 文 献

- [1] Fabbretti A, Gualerzi C O, Brandi L. How to cope with the quest for new antibiotics. *Febs Lett*, 2011, **585**(11): 1673–1681
- [2] Reddy K V R, Yedery R D, Aranha C. Antimicrobial peptides: Premises and promises. *Int J Antimicrob Ag*, 2004, **24**(6): 536–547
- [3] Sato H, Feix J B. Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *BBA-Biomembranes*, 2006, **1758**(9): 1245–1256
- [4] Keymanesh K, Soltani S, Sardari S. Application of antimicrobial peptides in agriculture and food industry. *World J Microb Biot*, 2009, **25**(6): 933–944
- [5] Brogden N K, Brogden K A. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals?. *Int J Antimicrob Ag*, 2011, **38**(3): 217–225
- [6] Giuliani A, Rinaldi A. Beyond natural antimicrobial peptides: Multimeric peptides and other peptidomimetic approaches. *Cell Mol Life Sci*, 2011, **68**(13): 2255–2266
- [7] Rotem S, Mor A. Antimicrobial peptide mimics for improved therapeutic properties. *BBA-Biomembranes*, 2009, **1788**(8): 1582–1592
- [8] John A R. Protein epitope mimetics as anti-infectives. *Curr Opin Chem Biol*, 2011, **15**(3): 379–386
- [9] Findlay B, Zhanel G G, Schweizer F. Cationic amphiphiles, a new generation of antimicrobials inspired by the natural antimicrobial peptide scaffold. *Antimicrob Agents Ch*, 2010, **54**(10): 4049–4058
- [10] Lienkamp K, Tew G N. Synthetic mimics of antimicrobial peptides—A versatile ring-opening metathesis polymerization based platform for the synthesis of selective antibacterial and cell-penetrating polymers. *Chem Eur J*, 2009, **15**(44): 11784–11800
- [11] Palermo E, Kuroda K. Structural determinants of antimicrobial activity in polymers which mimic host defense peptides. *Appl Microbiol Biot*, 2010, **87**(5): 1605–1615
- [12] Sang Y, Patil A, Zhang G, *et al.* Bioinformatic and expression analysis of novel porcine β -defensins. *Mamm Genome*, 2006, **17**(4): 332–339
- [13] Sang Y, Blecha F. Porcine host defense peptides: Expanding repertoire and functions. *Dev Comp Immunol*, 2009, **33**(3): 334–343
- [14] Hocquellet A, Odaert B, Cabanne C, *et al.* Structure-activity relationship of human liver-expressed antimicrobial peptide 2. *Peptides*, 2010, **31**(1): 58–66
- [15] Schroeder B O, Wu Z, Nuding S, *et al.* Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human β -defensin 1. *Nature*, 2011, **469**(7330): 419–423
- [16] Hoover D M, Rajashankar K R, Blumenthal R, *et al.* The structure of human β -defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization. *J Biol Chem*, 2000, **275**(42): 32911–32918
- [17] Wu Z, Hoover D M, Yang D, *et al.* Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human β -defensin 3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(15): 8880–8885
- [18] 韩菲菲, 安 沙, 谢永刚, 等. 猪乳铁蛋白肽的分子改良及改良肽的生物学活性研究. *动物营养学报*, 2011, **23**(2): 241–249
- [19] Han F F, An S, Xie Y G, *et al.* Chinese J Anim Nutr, 2011, **23**(2): 241–249
- [19] 马清泉, 单安山, 董 娜, 等. 富含亮氨酸和精氨酸的抗菌肽设计. *畜牧兽医学报*, 2011, **42**(6): 804–807
- [20] Ma Q Q, Shan A S, Dong N, *et al.* *Acta Vet Zootechnica Sin*, 2011, **42**(6): 804–807
- [20] Futaki S, Suzuki T, Ohashi W, *et al.* Arginine-rich peptides. *J Biol Chem*, 2001, **276**(8): 5836–5840
- [21] Kichler A, Leborgne C, März J, *et al.* Histidine-rich amphipathic peptide antibiotics promote efficient delivery of DNA into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(4): 1564–1568
- [22] Scudiero O, Galdiero S, Cantisani M, *et al.* Novel Synthetic, salt-resistant analogs of human beta-defensins 1 and 3 endowed with enhanced antimicrobial activity. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, **54**(6): 2312–2322
- [23] Catiau L, Traisnel J, Delval-Dubois V, *et al.* Minimal antimicrobial peptidic sequence from hemoglobin alpha-chain: KYR. *Peptides*, 2011, **32**(4): 633–638
- [24] Mathison R, Davison J, Befus A D, *et al.* Salivary gland derived

- peptides as a new class of anti-inflammatory agents: review of preclinical pharmacology of C-terminal peptides of SMR1 protein. *J Inflamm*, 2010, **7**(1): 49
- [25] Huang J, Hao D, Chen Y, *et al.* Inhibitory effects and mechanisms of physiological conditions on the activity of enantiomeric forms of an α -helical antibacterial peptide against bacteria. *Peptides*, 2011, **32**(7): 1488–1495
- [26] Pasupuleti M, Chalupka A, Mörgelin M, *et al.* Tryptophan end-tagging of antimicrobial peptides for increased potency against *Pseudomonas aeruginosa*. *BBA-Gen Subjects*, 2009, **1790**(8): 800–808
- [27] Schmidtchen A, Ringstad L, Kasetty G, *et al.* Membrane selectivity by W-tagging of antimicrobial peptides. *BBA-Biomembranes*, 2011, **1808**(4): 1081–1091
- [28] Tencza S B, Creighton D J, Yuan T, *et al.* Lentivirus-derived antimicrobial peptides: increased potency by sequence engineering and dimerization. *J Antimicrob Chemother*, 1999, **44**(1): 33–41
- [29] Yang S T, Kim J, Shin S. Effect of dimerization of a β -turn antimicrobial peptide, PST13-RK, on antimicrobial activity and mammalian cell toxicity. *Biotechnol Lett*, 2009, **31**(2): 233–237
- [30] Perron G G, Zasloff M, Bell G. Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. *Proc R Soc B-Biol Sci*, 2006, **273**(1583): 251–256
- [31] Yeaman M R, Yount N Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev*, 2003, **55**(1): 27–55
- [32] Takahashi D, Shukla S K, Prakash O, *et al.* Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity. *Biochimie*, 2010, **92**(9): 1236–1241
- [33] Wade D, Boman A, Wählén B, *et al.* All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**(12): 4761–4765
- [34] Shin S Y, Kang J H, Jang S Y, *et al.* Effects of the hinge region of cecropin A(1-8)-magainin 2(1-12), a synthetic antimicrobial peptide, on liposomes, bacterial and tumor cells. *BBA-Biomembranes*, 2000, **1463**(2): 209–218
- [35] Friedrich C, Scott M G, Karunaratne N, *et al.* Salt-resistant α -helical cationic antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, **43**(7): 1542–1548
- [36] Tian Z G, Dong T T, Teng D, *et al.* Design and characterization of novel hybrid peptides from LFB15(W4,10), HP(2-20), and cecropin A based on structure parameters by computer-aided method. *Appl Microbiol Biot*, 2009, **82**(6): 1097–1103
- [37] Huang W, Lu L, Shao X, *et al.* Anti-melanoma activity of hybrid peptide P18 and its mechanism of action. *Biotechnol Lett*, 2010, **32**(4): 463–469
- [38] Lu X M, Jin X B, Zhu J Y, *et al.* Expression of the antimicrobial peptide cecropin fused with human lysozyme in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biot*, 2010, **87**(6): 2169–2176
- [39] Piers K L, Brown M H, Hancock R E W. Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria. *Gene*, 1993, **134**(1): 7–13
- [40] Jin F, Xu X, Wang L, *et al.* Expression of recombinant hybrid peptide cecropin A (1-8)-magainin 2 (1-12) in *Pichia pastoris*: Purification and characterization. *Protein Express Purif*, 2006, **50**(2): 147–156
- [41] Xu X, Jin F, Yu X, *et al.* High-level expression of the recombinant hybrid peptide cecropin A(1-8)-magainin 2(1-12) with an ubiquitin fusion partner in *Escherichia coli*. *Protein Express Purif*, 2007, **55**(1): 175–182
- [42] He J, Anderson M H, Shi W, *et al.* Design and activity of a 'dual-targeted' antimicrobial peptide. *Int J Antimicrob Ag*, 2009, **33**(6): 532–537
- [43] Eckert R, He J, Yarbrough D K, *et al.* Targeted killing of streptococcus mutans by a pheromone-guided "smart" antimicrobial peptide. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, **50**(11): 3651–3657
- [44] Franzman M R, Burnell K K, Dehkordi-Vakil F H, *et al.* Targeted antimicrobial activity of a specific IgG-SMAP28 conjugate against *Porphyromonas gingivalis* in a mixed culture. *Int J Antimicrob Ag*, 2009, **33**(1): 14–20
- [45] An L L, Yang Y H, Ma X T, *et al.* LL-37 enhances adaptive antitumor immune response in a murine model when genetically fused with M-CSFRJ6-1 DNA vaccine. *Leukemia Res*, 2005, **29**(5): 535–543
- [46] Bera S, Zhanel G G, Schweizer F. Synthesis and antibacterial activity of amphiphilic lysine-ligated neomycin B conjugates. *Carbohydr Res*, 2011, **346**(5): 560–568
- [47] Chu-Kung A F, Nguyen R, Bozzelli K N, *et al.* Chain length dependence of antimicrobial peptide-fatty acid conjugate activity. *J Colloid Interf Sci*, 2010, **345**(2): 160–167
- [48] Hu W, Splith K, Neundorff I, *et al.* Influence of the metal center and linker on the intracellular distribution and biological activity of organometal-peptide conjugates. *J Biol Inorg Chem*, 2012, **17**(2): 175–185
- [49] He J, Yarbrough D K, Kreth J, *et al.* Systematic approach to optimizing specifically targeted antimicrobial peptides against streptococcus mutans. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, **54**(5): 2143–2151
- [50] Craik D, Anderson M, Barry D, *et al.* Discovery and structures of the cyclotides: novel macrocyclic peptides from plants. *Lett Pept Sci*, 2001, **8**(3): 119–128
- [51] Daly N L, Rosengren K J, Craik D J. Discovery, structure and biological activities of cyclotides. *Adv Drug Deliver Rev*, 2009, **61**(11): 918–930
- [52] Saether O, Craik D J, Campbell I D, *et al.* Elucidation of the primary and three-dimensional structure of the uterotonic polypeptide kalata B1. *Biochemistry*, 1995, **34**(13): 4147–4158
- [53] Mobli M, King G F. NMR methods for determining disulfide-bond connectivities. *Toxicon*, 2010, **56**(6): 849–854
- [54] Daly N L, Craik D J. Bioactive cystine knot proteins. *Curr Opin Chem Biol*, 2011, **15**(3): 362–368
- [55] Rosengren K J, Daly N L, Plan M R, *et al.* Twists, knots and rings in proteins: Structural definition of the cyclotide framework. *J Biol Chem*, 2003, **278**(10): 8606–8616
- [56] Henriques S T, Craik D J. Cyclotides as templates in drug design.

- Drug Discov Today, 2010, **15**(1-2): 57-64
- [57] David J C. Discovery and applications of the plant cyclotides. *Toxicon*, 2010, **56**(7): 1092-1102
- [58] Jagadish K, Camarero J A. Cyclotides, a promising molecular scaffold for peptide-based therapeutics. *Pept Sci*, 2010, **94**(5): 611-616
- [59] Costa F, Carvalho I F, Montelaro R C, *et al.* Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta Biomater*, 2011, **7**(4): 1431-1440
- [60] Shukla A, Fleming K E, Chuang H F, *et al.* Controlling the release of peptide antimicrobial agents from surfaces. *Biomaterials*, 2010, **31**(8): 2348-2357
- [61] Onaizi S A, Leong S S J. Tethering antimicrobial peptides: Current status and potential challenges. *Biotechnol Adv*, 2011, **29**(1): 67-74
- [62] Svetlana A S. Responsive polymer films and capsules via layer-by-layer assembly. *Curr Opin Colloid In*, 2005, **10**(1-2): 37-44
- [63] Bagheri M, Beyermann M, Dathe M. Immobilization reduces the activity of surface-bound cationic antimicrobial peptides with no influence upon the activity spectrum. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, **53**(3): 1132-1141
- [64] Izquierdo-Barba I, Vallet-Regí M, Kupferschmidt N, *et al.* Incorporation of antimicrobial compounds in mesoporous silica film monolith. *Biomaterials*, 2009, **30**(29): 5729-5736
- [65] Guyomard A, Dé E, Jouenne T, *et al.* Incorporation of a hydrophobic antibacterial peptide into amphiphilic polyelectrolyte multilayers: A bioinspired approach to prepare biocidal thin coatings. *Adv Funct Mater*, 2008, **18**(5): 758-765
- [66] Bower C K, McGuire J, Daeschel M A. Influences on the antimicrobial activity of surface-adsorbed nisin. *J Ind Microbiol Biot*, 1995, **15**(3): 227-233
- [67] Otvos L, Snyder C, Condie B, *et al.* Chimeric antimicrobial peptides exhibit multiple modes of action. *Int J Pept Res Ther*, 2005, **11**(1): 29-42
- [68] Cassone M, Vogiatzi P, La Montagna R, *et al.* Scope and limitations of the designer proline-rich antibacterial peptide dimer, A3-APO, alone or in synergy with conventional antibiotics. *Peptides*, 2008, **29**(11): 1878-1886

Research Advances in Modified Antimicrobial Peptides*

ZHU Xin, MA Qing-Quan, DONG Na, SHAN An-Shan**

(Institute of Animal Nutrition, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract The emergence of superbug, resistant to every widely used commercial antibiotics, has led to increasing environmental and health risks. Antimicrobial peptides (AMPs), which represent one of most promising substitutes for antibiotics, are earning interests on account of efficiency in fighting against pathogens and difference in action mechanism between AMPs and antibiotics from researchers all over the world. Indeed, early studies showed that AMPs were found extensively in nature, and had high antimicrobial activities and broad antimicrobial spectrum. Unfortunately, prior obstacles were urgently surmounted because of cytotoxicity, stability, and production cost of AMPs. Accordingly, to overcome these disadvantages, contemporary researchers are trying to apply rational methods and advanced technology to develop modified antimicrobial peptides. AMP mimetics, AMP congeners, hybrid AMPs, AMP conjugates, stabilized AMPs and immobilized AMPs have all emerged and have application potentials in husbandry, food and medicine. This review outlines recent advances of these modified antimicrobial peptides.

Key words antimicrobial peptides, molecular modification, feed, livestock, medicine

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00544

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31072046) and Department of Education of Heilongjiang (11551z003).

**Corresponding author.

Tel: 86-451-55190685, E-mail: asshan@mail.neau.edu.cn

Received: November 23, 2011 Accepted: February 20, 2012