

• 医药生物技术 •

# 青环海蛇抗菌肽 Hc-CATH 的分子设计及药效毒理优化

高久香<sup>1</sup>, 王义鹏<sup>2</sup>, 于海宁<sup>1</sup>

1 大连理工大学 生物工程学院, 辽宁 大连 116024

2 苏州大学 药学院, 江苏 苏州 215123

高久香, 王义鹏, 于海宁. 青环海蛇抗菌肽 Hc-CATH 的分子设计及药效毒理优化. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2534-2542.

Gao JX, Wang YP, Yu HN. Molecular design, pharmacology and toxicology optimization of antimicrobial peptide from *Hydrophis cyanocinctus*, Hc-CATH. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2534-2542.

**摘要:** 为获得分子量小、毒性低的抗感染多肽药物先导分子, 以来源于青环海蛇的 cathelicidin 家族抗菌肽 Hc-CATH 为模板, 设计了长度分别为 16 和 15 个氨基酸残基的改造体 Hc-16 和 Hc-15, 并通过 CCK8 实验、最小抑菌浓度 (Minimal inhibitory concentration, MIC) 实验、ELISA 实验和生物膜干涉技术 (Bio-layer interferometry, BLI), 对其进行毒性、抗菌活性、抗炎活性及 LPS 中和活性筛选。结果显示, 两种改造体中, Hc-16 对包括临床耐药菌在内的病原体具有广谱抗菌活性, 最小抑菌浓度仅为 4.69  $\mu\text{g/mL}$ 。同时抑制了 LPS 诱导的炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的表达, 显著降低感染诱发的炎症反应及细胞毒性。此外, 构效关系研究表明 C-、N-两端的苯丙氨酸在 Hc-16 抗菌抗炎活性中起着至关重要的作用。综上, Hc-16 改造肽相比原模板具有更高的抗菌抗炎活性、更低的毒性以及更小的分子量, 因而具有成本低、更好的成药性优势和较好的临床应用价值。

**关键词:** 抗菌肽, 结构改造, 抗菌, 抗炎, 疏水性氨基酸

**Received:** September 12, 2020; **Accepted:** October 22, 2020

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 31772455, 31872223), Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (No. BK20171214), Jiangsu Agricultural Science and Technology Innovation Fund, China [No. CX(19)3009], Suzhou Science and Technology Development Project (No. SNG2017045), Dalian University of Technology-Liaoning Cancer Hospital Medical-engineering Cross Interdisciplinary Foundation (No. DUT20YG128).

**Corresponding authors:** Haining Yu. Tel/Fax: 86-411-84708850; E-mail: yuhaining@dlut.edu.cn

Yipeng Wang. Tel/Fax: 86-512-65882090; E-mail: yipengwang@suda.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31772455, 31872223), 江苏省自然科学基金 (No. BK20171214), 江苏省农业科技自主创新资金项目 (No. CX(19)3009), 苏州市科技计划应用基础项目 (No. SNG2017045), 大连理工大学-辽宁省肿瘤医院医工交叉联合基金 (No. DUT20YG128) 资助。

网络出版时间: 2020-11-19

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20201119.1109.004.html>

# Molecular design, pharmacology and toxicology optimization of antimicrobial peptide from *Hydrophis cyanocinctus*, Hc-CATH

Jiuxiang Gao<sup>1</sup>, Yipeng Wang<sup>2</sup>, and Haining Yu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> School of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China

<sup>2</sup> College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu, China

**Abstract:** Based on the cathelicidin family antimicrobial peptide Hc-CATH derived from sea snake, the Hc-16 and Hc-15 of 16 and 15 amino acid residues, were designed. By using CCK8, minimal inhibitory concentration, ELISA and bio-layer interferometry assays, their cytotoxicity, antibacterial activity, anti-inflammatory activity, and LPS neutralization activity was examined. Compared with Hc-15, Hc-16 had lower cytotoxicity and better broad-spectrum antibacterial activity against pathogens including clinically resistant bacteria, with the minimum inhibitory concentration of only 4.69  $\mu\text{g/mL}$ . Hc-16 inhibited the expression of inflammatory cytokines of TNF- $\alpha$  and IL-6 induced by LPS, so as to significantly reduce the inflammatory response induced by infection. In addition, structure-activity relationship studies have shown that the phenylalanine at the C- and N-terminals of Hc-16 played a crucial role in its antibacterial and anti-inflammatory activity. Altogether, the designed Hc-16 has an excellent prospect to be developed into a novel antibiotic.

**Keywords:** antibacterial peptide, modification, antibacterial, anti-inflammatory, hydrophobic amino acid

抗生素耐药 (Antimicrobial resistant, AMR) 是全球最为突出的医疗问题之一, 对现代医学和患者的健康造成了严重威胁<sup>[1-3]</sup>。传统抗生素滥用导致耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌 (MRSA)、耐万古霉素肠球菌 (VRE)、超级细菌 (NDM-1) 等耐药菌的种类和数量持续增加, 严重影响和制约了传统抗生素的发展和临床应用, 目前迫切需要新型有效的抗生素药物解决耐药菌感染难题<sup>[4-6]</sup>。

Cathelicidins 是脊椎动物特有的抗菌肽 (Antimicrobial peptides, AMPs) 家族, 具有广谱抗菌、抗病毒、免疫调节、促进血管生成等多种功能, 加上其对多重耐药菌有效且不易产生耐药性等特点, 使其有望成为预防和治疗耐药性感染的最佳候选药物<sup>[7-8]</sup>。目前, 国外已有 3 种 cathelicidins 相关药物处于临床研究阶段<sup>[9-10]</sup>。

Hc-CATH 是从青环海蛇 *Hydrophis cyanocinctus* 毒腺内扩增得到的 cathelicidin 家族抗菌肽 (GenBank accession number: KP202856), 为首个从海洋爬行动物发现的 cathelicidin 家族抗菌肽。体内外实验显示 Hc-CATH 具有极好的抗菌活性和抗炎活性<sup>[11-12]</sup>。机理研究发现其可以中和脂多

糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 从而抑制炎症信号通路的发生<sup>[13-14]</sup>。

Hc-CATH 由 30 个氨基酸残基组成, 其活性结构主要为两亲性  $\alpha$  螺旋结构, 位于 1-17 位氨基酸序列。在前期研究中截取 Hc-CATH 两亲性  $\alpha$  螺旋区域, 并通过 N 端、C 端逐一删减法, 获得系列改造体。研究结果表明其 N 端氨基酸对抗菌活性影响较大, 但该系列改造体仍然具有抗菌活性强毒性大的缺点<sup>[15]</sup>。在本研究中, 通过多肽两边删减法获得改造体 Hc-16 及 Hc-15, 两个改造体仅相差一个氨基酸, 考察其抗菌活性、抗炎活性、细胞毒性及 LPS 中和能力变化, 为抗菌肽改造提供重要参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

原代小鼠腹腔巨噬细胞 (Mice peritoneal macrophages, MPMs), 来自本实验室提取; Hc-CATH 及改造体 Hc-16、Hc-15 由吉尔生化 (上海) 有限公司合成; 小鼠 TNF- $\alpha$  和 IL-6 ELISA 试剂盒购自杭州联科生物技术股份有限公司; Biotin

生物素标记试剂和 1640 培养基购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; PBS 购自碧云天生物技术有限公司; LPS (源于大肠杆菌 055:B5) 购自美国 Sigma 公司; 链霉亲和素传感器购自美国 MD 公司; 其他常规试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

## 1.2 结构研究

圆二色谱测定 (Circular dichroism, CD): 将 Hc-CATH 及改造体 Hc-16、Hc-15 分别溶解于纯水和生物膜模拟溶液 (30 mmol/L SDS) 中, 至终浓度 200  $\mu\text{g/mL}$ , 分别通过圆二色谱仪检测其在 190–260 nm 波长内特征图谱。

螺旋轮盘结构绘制: 通过在线网站 The Expert Protein Analysis System (ExPASy) proteomics server (<http://heliquet.ipmc.cnrs.fr/>), 将 Hc-CATH 螺旋结构 (前 17 个氨基酸) 及改造体 Hc-16、Hc-15 氨基酸信息输入, 获得螺旋结构图。

## 1.3 原代小鼠腹腔巨噬细胞提取与细胞毒性检测

1.5% 硫代乙醇酸钠注射 Balb/c 小鼠腹腔, 0.5 mL/只, 3 d 后, 使用预冷 1640 培养基腹腔灌注 5 mL/只, 按摩腹部 5 min, 收回培养基, 1 000 r/min 离心 5 min, 收集原代小鼠腹腔巨噬细胞 MPMs。

用含 5% 胎牛血清的 1640 培养基稀释 MPMs 细胞至  $2 \times 10^5$  个细胞/mL, 取 100  $\mu\text{L}$ /孔于无菌 96 孔细胞培养板中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  过夜培养。加入不同浓度 Hc-CATH 及改造体 Hc-16、Hc-15, 培养 24 h, 使用 CCK8 试剂检测药物对细胞的毒性作用。

## 1.4 抗菌活性筛选

通过最小抑菌浓度 (Minimal inhibitory concentration, MIC) 测定方法, 检测 Hc-CATH 及改造体 Hc-16、Hc-15 抗菌活性。

菌株培养: 平板划线, 挑取单菌落到 Mueller-Hinton (MH) 肉汤液体培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养至对数生长期。使用 MH 液体培养基稀释检测菌液至浓度为  $2 \times 10^5$  CFU/mL 备用。

抗菌肽样品的稀释与检测菌的共培养: 在无

菌 96 孔细胞培养板中, 将 Hc-CATH 及改造体 Hc-16、Hc-15 从最大浓度 400  $\mu\text{g/mL}$  开始, 进行 2 倍浓度梯度稀释, 直至最小浓度 0.4  $\mu\text{g/mL}$ 。向各孔中加入 50  $\mu\text{L}$  的  $2 \times 10^5$  CFU/mL 浓度的菌液, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、110 r/min 培养 16–18 h。

对照: 该实验中选择头孢哌酮/舒巴坦钠 (CPZ/SBT, 1:1, 悦康药业) 和氨苄西林钠 (Amp, 鲁抗医药) 作为阳性对照。

## 1.5 抗炎活性检测

提取 MPMs 细胞, 稀释浓度至  $2 \times 10^5$  个细胞/mL, 取 100  $\mu\text{L}$ /孔于 96 孔细胞培养板中, 在细胞培养箱内过夜培养。

预处理组: 细胞培养板内分别加入 5、10、15  $\mu\text{g/mL}$  的多肽样品, 培养 1 h 后, 用 PBS 轻轻清洗细胞去除游离药物, 加入含 100 ng/mL 的 LPS 培养基, 对照组分别为不加药物的 100 ng/mL LPS 组和完全培养基组。

共处理组: 细胞培养板内加入含 100 ng/mL LPS 及 5、10、15  $\mu\text{g/mL}$  抗菌肽药物, 对照组为不加抗菌肽药物仅含 100 ng/mL 的 LPS 组, 以及完全培养基组。

药物作用 16 h 后, 取细胞上清, 通过 ELISA 法检测炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 在 MEMs 细胞上清中的含量。

## 1.6 LPS 中和能力检测

利用生物膜干涉技术为原理的分子相互作用系统 (MD, Octet96e) 检测 Hc-CATH 及改造体 Hc-16、Hc-15 药物与 LPS 结合能力。首先使用生物素试剂分别标记抗菌肽样品, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、1 h 后, 通过链霉亲和素传感器 (SA sensor) 分别上机固定生物素化的抗菌肽样品, 另外使用动力学缓冲液 (含 0.01% BSA 和 0.02% Tween20 的 PBS 缓冲液, pH (7.4 $\pm$ 0.1)) 配制 LPS 至 25 nmol/L 并 2 倍梯度稀释 LPS 共 5 个浓度梯度。通过分子相互作用系统, 实时检测抗菌肽与 LPS 的结合、解离情况, 并计算亲和力 KD 值。

## 2 结果与分析

### 2.1 Hc-CATH 结构改造

研究发现肽的两亲性  $\alpha$  螺旋结构对其抗菌活性和抗炎活性必不可少, 并且电荷数会直接影响着抗菌肽的杀菌能力<sup>[11,16-17]</sup>。

Hc-CATH 具有两亲性  $\alpha$  螺旋结构, 位于其第 1–17 位氨基酸序列, 是 Hc-CATH 的活性结构 (见表 1 改造体序列信息), 该活性区域中正电荷数量与抗菌活性呈正相关。前期研究发现, 从 Hc-CATH 活性结构 C 端开始逐一删减氨基酸对抗菌活性影响较小, 尤其 R<sub>18</sub>K<sub>19</sub> 氨基酸去除后其抗菌活性几乎不变, 但 F<sub>17</sub> 去除后抗菌活性呈现明显递减趋势。

Hc-CATH 活性结构的 N 端 K<sub>1</sub>F<sub>2</sub>F<sub>3</sub> 位对抗菌活性影响较大, 若删除 K<sub>1</sub>F<sub>2</sub>F<sub>3</sub> 其抗菌活性完全消失<sup>[15]</sup>。设计改造体 Hc-16 保留了 Hc-CATH 活性结构两端的苯丙氨酸, 改造体 Hc-15 缺失一个 N 端苯丙氨酸, 两个改造体均带有 7 个正电荷, 以考察 N 端氨基酸对抗菌活性、抗炎活性的影响。

### 2.2 Hc-CATH 及改造体细胞毒性

Hc-CATH 以及改造体对 MPMs 细胞毒性呈浓度依赖关系, 且具有显著性差异, 如图 1 所示。通过软件计算获得 Hc-CATH、Hc-16 和 Hc-15 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 12、16、25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。改造体 Hc-16 与 Hc-15 细胞毒性较 Hc-CATH 均有所降低, 在浓度为 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 仅 Hc-CATH 有超过半数细胞死亡; 在活性浓度范围内, 即 5–15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度检测范围内, 改造体 Hc-16 及 Hc-15 呈现更好的低毒优势。

表 1 Hc-CATH 改造体氨基酸序列信息

Table 1 Amino sequence of Hc-CATH derivatives

Peptide	Sequence	Net charge	Amino number
Hc-CATH	KFFKRLLSVRRRAVKKFRK KPLRIGLSTLL-NH <sub>2</sub>	12	30
Hc-16	FFKRLLSVRRRAVKKF-NH <sub>2</sub>	7	16
Hc-15	FKRLLSVRRRAVKKF-NH <sub>2</sub>	7	15

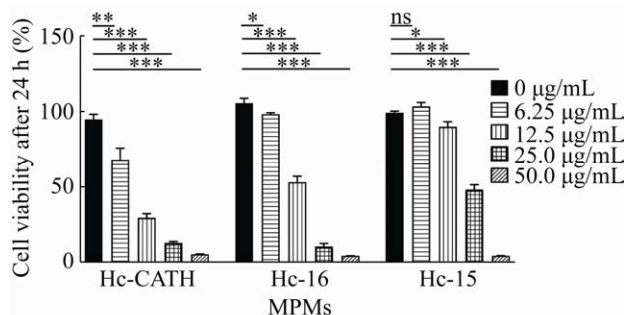


图 1 Hc-CATH 及改造体细胞毒性

Fig. 1 Cytotoxicity of Hc-CATH derivatives. MPMs were cultured with series concentrations of Hc-CATH derivatives at 37 °C for 24 h, then the cell viability was determined by CCK8 method. \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$  significantly different compared to the control.

### 2.3 Hc-CATH 及改造体抗菌活性

选取革兰氏阳性菌、阴性菌及真菌, 包括大量从临床病人分离获取的耐药菌株, 进行最小抑菌浓度检测, 结果见表 2。

改造体 Hc-16 与 Hc-15 对革兰氏阳性菌、阴性菌及真菌均有抗菌活性, 保留了广谱抗菌活性。Hc-16 抗菌活性与模板 Hc-CATH 类似, 显著优于 Hc-15。从其氨基酸序列可知, Hc-16 与模板 Hc-CATH 的  $\alpha$  螺旋结构相比, 减少了一个碱性氨基酸, 其毒性有所降低, 但活性也略有下降。而 Hc-15 与 Hc-16 相比, 减少了一个疏水性氨基酸, 抗菌活性明显下降, 但毒性变化相对不明显。说明疏水性苯丙氨酸在抗菌活性和细胞膜毒性中起着至关重要的桥梁作用。

### 2.4 Hc-CATH 及改造体抗炎活性

从图 2 可知, Hc-16 不同浓度组均可以显著抑制 LPS 诱导的小鼠原代腹腔巨噬细胞炎症因子 TNF- $\alpha$  与 IL-6 的表达具有浓度依赖关系。Hc-16 高浓度共处理组对 TNF- $\alpha$  和 IL-6 抑制率分别为 78%、70%, 预处理组抑制率分别为 90%、56%, 而 Hc-15 抗炎活性较差仅高浓度组具有显著抑制活性。从预处理组结果可知, 去除培养基中游离的 Hc-16、Hc-15 后, 抗菌肽组仍然具有抗炎活性。在前期研究中通过流式细胞术证实 Hc-CATH 可

表 2 Hc-CATH 及其改造体最小抑菌浓度

Table 2 Minimum inhibitory concentration of Hc-CATH and its analogue

Microorganisms	Hc-CATH	Hc-16	Hc-15	MZP/SBT	Amp
Gram-negative bacteria					
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	4.69	37.5	—	0.29	18.75
<i>E. coli</i> 1 (CIb)	9.38	18.8	75	37.5	—
<i>E. coli</i> 3 (CI)	9.38	37.5	—	0.15	—
<i>Shigella dysenteriae</i> (CI)	4.69	4.69	37.5	0.15	—
<i>Proteus mirabilis</i> (CI)	4.69	9.38	150	4.69	75
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CI)	37.5	37.5	—	0.29	—
<i>P. aeruginosa</i> 1 (CI)	4.69	4.69	4.69	2.34	—
<i>Salmonella paratyphi A</i> (CI)	4.69	37.5	—	18.8	—
Gram-positive bacteria					
<i>Staphylococcus aureus</i> (CI)	18.75	4.69	18.8	0.29	9.38
<i>Nocardia asteroides</i> (CI)	9.38	18.8	—	0.59	18.75
Fungi					
<i>Candida albicans</i> (CI)	18.75	150	150	4.69	—
<i>Candida glabrata</i> 1 (CI)	9.375	75	—	2.34	—
<i>C. glabrata</i> 2 (CI)	2.34	37.5	37.5	18.8	18.75
<i>Arcyria cinerea</i> (CI)	9.38	18.8	150	4.69	—

<sup>a</sup>CI: clinical isolated strain; <sup>b</sup>CPZ/SBT: cefoperazone/sulbactam (1:1); <sup>c</sup>Amp, ampicillin; “—”: no detectable activity at the concentration of 200 µg/mL.

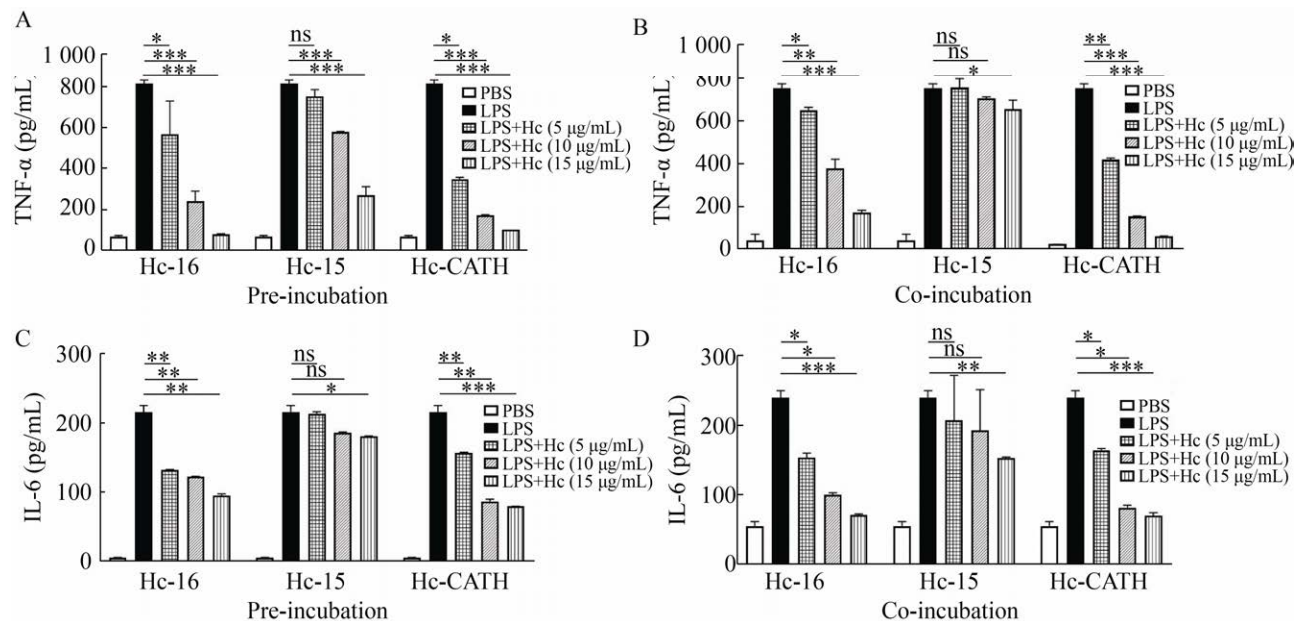


图 2 Hc-CATH 及其改造体对炎症因子表达的影响

Fig. 2 Effects of Hc-CATH and its analogue on LPS-induced pro-inflammatory cytokines production. (A) TNF- $\alpha$  production in the pre-incubation group. (B) TNF- $\alpha$  production in the co-incubation group. (C) IL-6 production in the pre-incubation group. (D) IL-6 production in the co-incubation group. In pre-incubation group, MPMs were pre-incubated with peptides (5, 10, and 15 µg/mL) for 1 h, washed 2 times with PBS buffer to remove the peptides, and then stimulated with LPS (100 ng/mL). After 16 h, the cell culture supernatants were collected for determination of the secretion of TNF- $\alpha$ /IL-6 by ELISA. In co-incubation group, MPMs were co-incubated with LPS (100 ng/mL) and peptides (5, 10, and 15 µg/mL). After 16 h, the cell culture supernatants were collected for determination of the secretion of TNF- $\alpha$ /IL-6 by ELISA. \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$  significantly different compared to the control.

以与 MPMs 细胞表面 TLR4 受体结合, 推测改造体具有同 Hc-CATH 相同的抗炎机理, 即与细胞表面受体 TLR4/MD2 复合物结合, 从而抑制炎症下游信号的发生<sup>[11]</sup>。

Hc-16 与 Hc-CATH 的抗炎活性相当, 且明显优于 Hc-15, 推测截断肽在 C 末端的疏水性氨基酸——苯丙氨酸对抗炎活性影响很大。

## 2.5 LPS 中和活性

LPS 通过与巨噬细胞表面的 TLR4 受体结合, 激活 MAPK 炎症通路, 诱导炎症因子表达。所以中和 LPS 毒性, 可以阻止炎症过度发生<sup>[18]</sup>。

本研究通过 BLI 技术检测 Hc-CATH 及改造体 Hc-16、Hc-15 与 LPS 的结合作用。从动力学曲线 (图 3) 可知, Hc-CATH 及改造体 Hc-16、Hc-15 与 LPS 结合后具有慢解离现象, 即结合紧密不易解离, 这使得抗菌肽可以牢牢抓住 LPS 从而阻止炎症的激活和过度发生。

前期研究中, 通过微量热泳动 (Microscale thermophoresis, MST) 实验证实了 Hc-CATH 可以与 LPS 发生相互作用, 另外通过 LAL 细菌内毒素 (脂多糖) 检测实验证明 Hc-CATH 具有中和 LPS 的能力<sup>[11]</sup>。本研究通过 BLI 实验发现, Hc-CATH 和改造体 Hc-16、Hc-15 与 LPS 具有相互作用, 其亲和力 KD 值相近 (表 3), 结合与解离趋势相同, 推测改造体同模板 Hc-CATH 结合 LPS 的方式相同。

## 2.6 构效关系

通过圆二色谱实验 (图 4) 可知, Hc-CATH 及改造体 Hc-16 和 Hc-15 在水溶液中呈现无规则卷曲结构, 在疏水环境下 CD 图谱在 190 nm 出现正峰, 在 208 nm 和 222 nm 处出现两个负峰, 呈现典型的  $\alpha$  螺旋特征峰。

改造体 Hc-16 和 Hc-15 都属于两亲性  $\alpha$  螺旋肽, 即碱性氨基酸和疏水性氨基酸分别排列在螺旋的两侧, 其两亲性  $\alpha$  螺旋横切面氨基酸排列顺序如图 5 所示。这种两亲性  $\alpha$  螺旋结构更利于抗菌肽在细菌膜上造成孔洞, 快速杀菌, 不易产生耐药性。

改造体 Hc-16 与 Hc-CATH 活性结构相比, 仅相差一个正电荷氨基酸——精氨酸, 却保留了 Hc-CATH 的抗菌活性和抗炎活性。

改造体 Hc-16 与 Hc-15 相比, 活性区域相差一个疏水性氨基酸——苯丙氨酸, 但 Hc-15 的抗菌活性和抗炎活性同时减少约一倍。说明与带电荷相比, 疏水性氨基酸在该活性结构中占有更重要的地位。

## 3 讨论

AMPs 是广泛存在于生物体内的一类活性小肽, 目前约有 4 000 种抗菌肽 (天然存在、设计或改造) 被研究和发现<sup>[19-22]</sup>。在当前大量抗菌肽模板存在的条件下, 如何进行抗菌肽优化, 进一步提高现有抗菌肽成药性, 是解决抗菌肽药物开发瓶颈和加速药物上市的重要工作<sup>[23-25]</sup>。

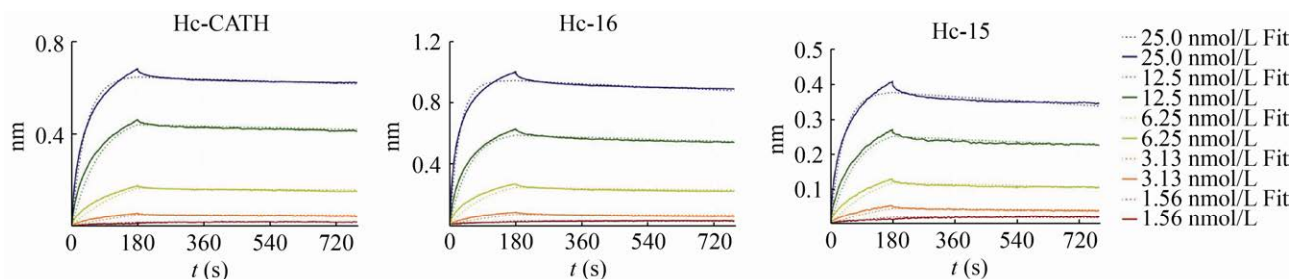


图 3 Hc-CATH 及改造体与 LPS 相互作用

Fig. 3 Interaction between LPS and Hc-CATH derivatives by BLI measurement.

表 3 Hc-CATH 及改造体与 LPS 相互作用的动力学参数

Table 3 Kinetic parameters of interaction between Hc-CATH derivatives and LPS

Peptide	KD (mol/L)	Kon (L/(mol·s))	Kdis (1/s)
Hc-CATH	7.33E-11	3.69E-12	1.09E+06
Hc-16	8.10E-11	2.77E-12	1.52E+06
Hc-15	1.68E-10	4.94E-12	1.09E+06

修饰和设计使得人工合成 AMPs 具有更多可能性, 但 AMPs 的合成与传统抗生素相比制造成本较高。从生产成本角度出发, 改造体 Hc-16 氨基酸数量约占 Hc-CATH (30 个氨基酸残基) 的一半 (表 1), 更利于产品后期开发。

从药效角度出发, Hc-16 不仅具有广谱抗菌活性, 且对临床耐药菌有效。如表 2 所示, Hc-16 对临床耐药菌痢疾志贺菌、铜绿假单胞杆菌、金黄色葡萄球菌的 MIC 值为 4.69  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

此外, Hc-16 保留了模板 Hc-CATH 的抗炎活性, 该活性在急性感染过程中至关重要。在急性感染过程中, 机体炎症过度发生, 可引起多种疾病甚至死亡。多重耐药菌引起的普通感染、耐药菌的定植、败血症、脓毒性休克等急性感染, 往往具有反复性、致命性。在这类耐药菌引起的疾病尤其是急性感染疾病中, 抗菌肽 Hc-16 在快速清除疾病细菌感染的同时, 可以抑制炎症因子过度表达。这种保护性激活先天免疫系统是生物体

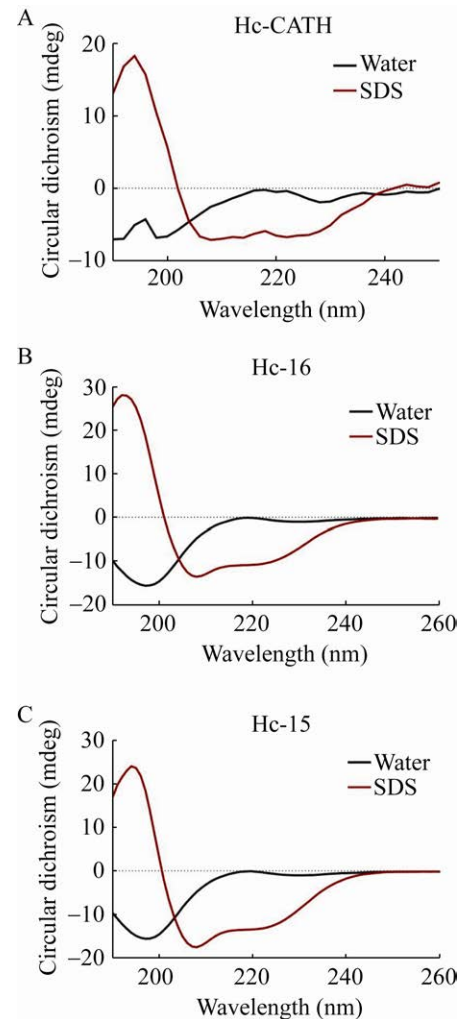


图 4 Hc-CATH 及改造体圆二色谱图谱

Fig. 4 Circular dichroism spectra of Hc-CATH and its analogue.

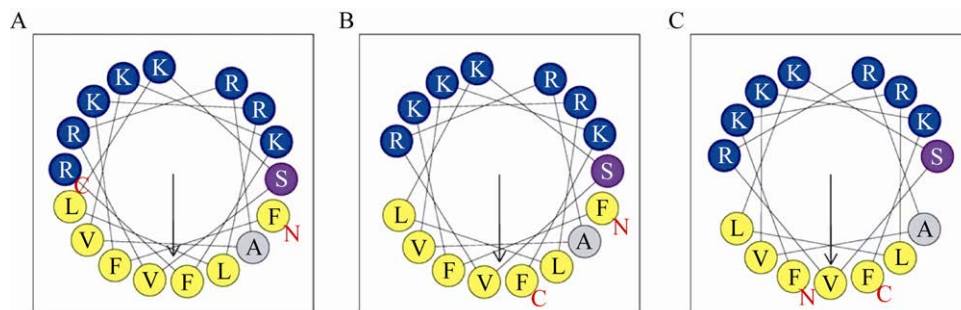


图 5 Hc-CATH 及改造体  $\alpha$  螺旋区轮盘模拟图

Fig. 5 Alpha helix area of Hc-CATH and its analogue. (A) Helix-wheel diagram of Hc-CATH alpha-helix region. (B) Helix-wheel diagram of Hc-16. (C) Helix-wheel diagram of Hc-15. (A-C) plotted by the software package of The Expert Protein Analysis System (ExPASy) proteomics server (<http://heliquet.ipmc.cnrs.fr/>). Hydrophobic amino acids are shown in yellow and grey. Hydrophilic amino acids are shown in blue and purple.

早期促进感染清除并预防炎症过度发生的关键机制之一<sup>[26-27]</sup>。

从毒性角度出发, 抗菌肽往往在抗菌浓度范围内, 存在着一定的毒副作用。两亲性  $\alpha$  螺旋肽结构改造中, 随着抗菌活性的增强, 其毒性具有增大趋势。综合活性与毒性, Hc-16 既保留 Hc-CATH 抗菌抗炎活性, 又降低了毒性, 可减少产品后期开发因毒性终止造成资金损失的风险。

从结构改造角度出发, 获得候选抗菌肽药物仍然是一个非常巨大的工程, 目前两亲性  $\alpha$  螺旋肽的改造点多聚集在碱性氨基酸替换和保护方面<sup>[16]</sup>。值得一提的是, 从本次抗菌 (表 2) 和抗炎 (图 2) 试验结果中发现, Hc-16 序列两端的疏水性氨基酸——苯丙氨酸, 在两亲性  $\alpha$  螺旋肽发挥抗菌、抗炎作用中具有非常重要的作用。综上所述, 本研究成功利用抗菌肽结构改造的策略, 为抗菌抗炎多肽药物研究和应用提供重要参考和数据支持。

## REFERENCES

- [1] Klein EY, van Boeckel TP, Martinez EM, et al. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(15): E3463-E3470.
- [2] Van Boeckel TP, Pires J, Silvester R, et al. Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and middle-income countries. *Science*, 2019, 365(6459): w1944.
- [3] Lim C, Takahashi E, Hongsuwan M, et al. Epidemiology and burden of multidrug-resistant bacterial infection in a developing country. *Elife*, 2016, 5(6): e18082.
- [4] Mazzariol A, Bazaj A, Cornaglia G. Multi-drug-resistant gram-negative bacteria causing urinary tract infections: a review. *J Chemother*, 2017, 29(sup1): 2-9.
- [5] Limmathurotsakul D, Dunachie S, Fukuda K, et al. Improving the estimation of the global burden of antimicrobial resistant infections. *Lancet Infect Dis*, 2019, 19(11): e392-e398.
- [6] Liu C, Yoon EJ, Kim D, et al. Antimicrobial resistance in South Korea: a report from the Korean global antimicrobial resistance surveillance system (Kor-GLASS) for 2017. *J Infect Chemother*, 2019, 25(11): 845-859.
- [7] Boto A, Perez DLLJ, Gonzalez CC. The road from host-defense peptides to a new generation of antimicrobial drugs. *Molecules*, 2018, 23(2): 311.
- [8] Hirsch T, Jacobsen F, Steinau HU, et al. Host defense peptides and the new line of defence against multiresistant infections. *Protein Pept Lett*, 2008, 15(3): 238-243.
- [9] Greber KE, Dawgul M. Antimicrobial peptides under clinical trials. *Curr Top Med Chem*, 2017, 17(5): 620-628.
- [10] Mookherjee N, Anderson MA, Haagsman HP, et al. Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(5): 311-332.
- [11] Wei L, Gao JX, Zhang SM, et al. Identification and characterization of the first cathelicidin from sea snakes with potent antimicrobial and anti-inflammatory activity and special mechanism. *J Biol Chem*, 2015, 290(27): 16633-16652.
- [12] Carlile SR, Shiels J, Kerrigan L, et al. Sea snake cathelicidin (Hc-cath) exerts a protective effect in mouse models of lung inflammation and infection. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 6071.
- [13] Ryu JK, Kim SJ, Rah SH, et al. Reconstruction of LPS transfer cascade reveals structural determinants within LBP, CD14, and TLR4-MD2 for efficient LPS recognition and transfer. *Immunity*, 2017, 46(1): 38-50.
- [14] Park S, Shin HJ, Shah M, et al. TLR4/MD2 specific peptides stalled *in vivo* LPS-induced immune exacerbation. *Biomaterials*, 2017, 126: 49-60.
- [15] Gao JX, Zhang MH, Zhang F, et al. Design of a Sea snake antimicrobial peptide derivative with therapeutic potential against drug-resistant bacterial infection. *ACS Infect Dis*, 2020, 6(9): 2451-2467.
- [16] Mant CT, Jiang Z, Gera L, et al. *De novo* designed amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides incorporating dab and dap residues on the polar face to treat the gram-negative pathogen, *acinetobacter*



- baumannii*. J Med Chem, 2019, 62(7): 3354-3366.
- [17] Tossi A, Sandri L, Giangaspero A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. Biopolymers, 2000, 55(1): 4-30.
- [18] Bode JG, Ehltng C, Haussinger D. The macrophage response towards LPS and its control through the p38(MAPK)-STAT3 axis. Cell Signal, 2012, 24(6): 1185-1194.
- [19] Xia X, Zhang L, Wang Y. The antimicrobial peptide cathelicidin-BF could be a potential therapeutic for *Salmonella typhimurium* infection. Microbiol Res, 2015, 171: 45-51.
- [20] Wu J, Yang J, Wang XF, et al. A frog cathelicidin peptide effectively promotes cutaneous wound healing in mice. Biochem J, 2018, 475(17): 2785-2799.
- [21] Nakagawa Y, Gallo RL. Endogenous intracellular cathelicidin enhances TLR9 activation in dendritic cells and macrophages. J Immunol, 2015, 194(3): 1274-1284.
- [22] Xing MC, Ji MY, Hu JM, et al. Snake cathelicidin derived peptide inhibits zika virus infection. Front Microbiol, 2020, 11: 1871.
- [23] Zhao XW, Wu HY, Lu HR, et al. LAMP: A database linking antimicrobial peptides. PLoS ONE, 2013, 8(6): e66557.
- [24] Waghv FH, Idicula-Thomas S. Collection of antimicrobial peptides database and its derivatives: applications and beyond. Protein Sci, 2020, 29(1): 36-42.
- [25] Wang GS, Li X, Wang Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. Nucleic Acids Res, 2016, 44(D1): D1087-D1093.
- [26] Scott MG, Dullaghan E, Mookherjee N, et al. An anti-infective peptide that selectively modulates the innate immune response. Nat Biotechnol, 2007, 25(4): 465-472.
- [27] Nijnik A, Madera L, Ma S, et al. Synthetic cationic peptide IDR-1002 provides protection against bacterial infections through chemokine induction and enhanced leukocyte recruitment. J Immunol, 2010, 184(5): 2539-2550.

(本文责编 陈宏宇)