

• 动物及兽医生物技术 •

## 抗菌肽 RIKL 的分子设计及生物学活性分析

方禹鑫, 李玲, 付文华, 董娜, 单安山

东北农业大学 动物营养研究所, 黑龙江 哈尔滨 150030

方禹鑫, 李玲, 付文华, 董娜, 单安山. 抗菌肽 RIKL 的分子设计及生物学活性分析. 生物工程学报, 2022, 38(1): 174-184.  
FANG YX, LI L, FU WH, DONG N, SHAN AS. Molecular design and biological activity analysis of antimicrobial peptide RIKL. Chin J Biotech, 2022, 38(1): 174-184.

**摘要:**天然抗菌肽具有较强的杀菌能力,但高生物相容性抗菌肽的构建一直阻碍着该领域的发展。为了提高抗菌肽的选择特异性,通过分子动力学分析探讨了抗菌肽的结构特性,并检测其生物学活性。首先以  $(RXKY)_2(YRY)_2$  (X 代表 Ile, Y 代表 Leu) 为模板设计新型抗菌肽分子 RIKL。通过圆二色谱 (circular dichroism, CD) 检测 RIKL 的二级结构,并通过分子动力学分析模拟了 RIKL 在水溶液和 POPC/POPG 膜环境下的结构,同时通过检测抑菌活性、溶血活性、细胞毒性及盐离子稳定性等指标进一步研究其生物学活性。CD 结果表明,RIKL 在细菌膜模拟环境下呈现  $\alpha$ -螺旋结构,分子动力学模拟预测了 RIKL 可以在水溶液和 POPG 环境下保留部分二级结构,而在 POPC 环境下分子的二级结构含量有所降低。抑菌试验表明 RIKL 具有较高的抑菌活性,其最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 的几何平均值为  $3.1 \mu\text{mol/L}$ ;溶血和细胞毒性试验表明,RIKL 在检测范围内无溶血活性、细胞毒性较低;稳定性试验发现,RIKL 在不同 pH 值、不同浓度血清和盐离子存在的环境下仍保持抑菌活性。综合以上结果,RIKL 具有较高的细胞选择性,有成为高效抗菌药物的发展潜力。

**关键词:** 抗菌肽; 分子动力学; 抑菌活性; 毒性; 稳定性

Received: March 17, 2021; Accepted: July 16, 2021; Published online: July 26, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (32030101, 31972580)

Corresponding author: DONG Na. E-mail: ndong@neau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (32030101, 31972580)

# Molecular design and biological activity analysis of antimicrobial peptide RIKL

FANG Yuxin, LI Ling, FU Wenhua, DONG Na, SHAN Anshan

Institute of Animal Nutrition, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China

**Abstract:** Natural antimicrobial peptides have strong bactericidal activities. An obstacle of the development of antimicrobial peptides resides in the difficulty of developing peptides with high biocompatibility. In this study, molecular dynamics analysis was employed to assess the structural characteristics and biological activities of peptides. A  $(RXKY)_2(YRY)_2$  structure was used as a template to design an antimicrobial peptide RIKL of high-efficiency and low-toxicity, where X represents Ile and Y represents Leu. The secondary structure of the antimicrobial peptide was detected by circular dichroism (CD), and the structures of RIKL in water and in POPC/POPG membrane environment were measured using molecular dynamics. The biological activity of RIKL was further studied by assessing its antimicrobial activity, hemolytic activity, eukaryotic cytotoxicity, and salt ion stability. CD results showed that RIKL presented an  $\alpha$ -helical structure in a simulated bacterial membrane environment. Molecular dynamics simulation predicted that the secondary structure of RIKL could be partly retained in water and POPG environment, while this secondary structure was weakened in the POPC environment. Antimicrobial test suggested that RIKL had high antimicrobial activities, and the geometric mean of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was  $3.1 \mu\text{mol/L}$ . The hemolysis indicated that RIKL had no hemolytic activity within the detection range, and cytotoxicity test suggested the cytotoxicity of RIKL was low. Stability test showed that RIKL maintained antimicrobial activities under different pH, serum concentrations and salt environments. Based on the above results, RIKL has high cell selectivity and has the potential as a highly effective antibacterial drug.

**Keywords:** antimicrobial peptides; molecular dynamics; antimicrobial activity; toxicity; stability

近半个世纪以来, 抗生素在促进畜禽生长方面发挥着重要的作用<sup>[1]</sup>。然而, 自从发现第一例超级耐药细菌以来, 抗生素在畜禽体内残留和耐药性问题引起全世界的广泛关注。人们迫切需要一种新的物质来代替传统的抗生素。抗菌肽 (antimicrobial peptides), 又称宿主防御肽 (host defense peptides)<sup>[2]</sup>, 具有抗菌性、低毒性和无残留等优点, 也可以抵抗并消灭来自外界入侵的病原体<sup>[3]</sup>, 同时清除自身的病变细胞和有害物质<sup>[4]</sup>。抗菌肽不仅对革兰氏阴性和

阳性细菌、真菌有杀灭作用, 而且对病毒、寄生虫和肿瘤细胞也具有抑制活性。研究发现, 抗菌肽与传统抗生素的杀菌机制有显著差异<sup>[5]</sup>。抗菌肽以物理方式作用于细菌细胞膜, 破坏细胞膜并使细胞质溢出, 或与细菌核糖体结合以阻止 DNA 合成, 从而快速杀死细菌, 这使得细菌几乎不会对抗菌肽产生耐药性<sup>[6]</sup>。然而, 在抗菌肽的研发过程中, 仍存在诸多亟待解决的技术问题, 例如难以预测天然抗菌肽的生物学活性和细胞相容性以及构效关系。

研究发现,通过改变肽链的氨基酸序列和理化参数,使用肽序列模板重新设计抗菌肽可提高肽的抗菌活性,并降低毒副作用<sup>[7]</sup>。简化模板法可以根据抗菌肽的理化性质以及规则的二级结构来预测并设计抗菌肽的序列。由于抗菌肽的疏水性在一定范围内影响其抑菌活性<sup>[8]</sup>,所以通过调整疏水性氨基酸在抗菌肽序列中的位置或增加氨基酸数量能够在一定范围内提高其抑菌活性<sup>[9]</sup>; Itoh 等筛选出了 18 个溶菌素 E 类似物 A1-A18,其中除了 A15 外,其他的抗菌肽均具有共同残基亮氨酸 (Leu) 和异亮氨酸 (Ile),表现出了较高的抗革兰氏阳性菌的膜破坏能力,揭示了疏水性氨基酸 Leu 和 Ile 对于抗革兰氏阳性菌甚至是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的潜在优势<sup>[10]</sup>。富含 Ile 的阳离子多肽能够有效地提高多肽的抑菌活性<sup>[11]</sup>。研究表明,在饲料中添加 Ile 可以有效地刺激仔猪产生  $\beta$ -防御素,并通过降低大肠杆菌产生的内毒素使仔猪免受菌体感染<sup>[12]</sup>。阳离子性可以促进抗菌肽与菌体细胞膜的静电吸引<sup>[13]</sup>,精氨酸侧链的胍基可以促进抗菌肽与微生物细胞膜接触<sup>[14]</sup>。尽管赖氨酸也携带一个正电荷,但是由于侧链缺乏胍基,降低了对哺乳动物细胞的毒性,所以细胞选择性比较高<sup>[15]</sup>。因此,本研究采用带正电荷氨基酸(精氨酸和赖氨酸)与疏水性氨基酸(亮氨酸和异亮氨酸)交替连接的方法来构建抗菌肽的基础骨架。

目前,分子动力学模拟(molecular dynamics simulation, MD simulation)已经成为研究生物大分子结构的常用方法。抗菌肽可以有效抑制细菌肽聚糖的合成,但是活性一直受限,通过 GROMACS 程序包筛选靶向 MurD 酶的药物来抑制鼠伤寒沙门氏菌肽聚糖的合成,证明了 3-(氨甲基)-*n*-(4-甲氧基苯基)苯胺是有效的肽

聚糖抑制剂<sup>[16]</sup>。另外,对含有组氨酸的抗菌肽与 POPC 进行分子动力学模拟,发现无论组氨酸是否被质子化,肽段更倾向于与双层毛孔紧密结合,这也解释了含组氨酸抗菌肽的膜破坏机制<sup>[17]</sup>。

本研究以(RXKY)<sub>2</sub>(YRY)<sub>2</sub>(X 代表 Ile, Y 代表 Leu)为模板全新设计抗菌肽 RIKL。检测该抗菌肽(RIKL)和对照肽蜂毒素(melittin, ME)的二级结构并进行分子动力学计算,分析其最小抑菌浓度、溶血活性、真核细胞毒性和稳定性。本研究为高生物相容性和高抑菌活性抗菌肽的设计提供了新的方法,对研发新型抗生素替代产品意义重大。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 抗菌肽合成

抗菌肽由吉尔生化公司(中国上海)合成,采用反相高效液相色谱和基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱鉴定。多肽纯度均高于 95%。抗菌肽以 2 560  $\mu\text{mol/L}$  的浓度溶解于去离子水中,并储存在  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

本研究使用 CCS 量表(<http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/HydroCalc/HydroMCalc.html>)在线计算平均疏水性和相对疏水力矩;使用 Pymol 获取抗菌肽的 PDB 结构文件。

#### 1.1.2 菌株和试剂

大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC 25922、*Escherichia coli* UB1005、*Escherichia coli* K88, 鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, 鸡白痢沙门氏菌 *Salmonella pullorum* C79-13, 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213、*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, 表皮葡萄球菌 *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* CMCC 63501 均由东北农业大学兽医学院馈赠(哈尔滨)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 二级结构分析

抗菌肽的二级结构使用 CD 色谱来检测<sup>[18]</sup>。将浓度为 150  $\mu\text{mol/L}$  的肽溶解在 10 mmol/L 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 和 50% 三氟乙醇 (TFE)。采用圆二色性光谱仪 (Jasco, Tokyo, Japan) 在 25  $^{\circ}\text{C}$  下测定。

### 1.2.2 分子动力学计算

利用 Pymol 生成 RIKL 的多肽坐标文件, 使用 GROMACS 程序包对 RIKL 的初始结构在水溶液中进行 MD 模拟<sup>[19]</sup>。首先将抗菌肽 RIKL 置于大小为 1 nm $\times$ 1 nm $\times$ 1 nm 的立方体盒子中并选择全原子力场。随后将 RIKL 溶剂化, 置于 SPC216 水溶液中, 整个体系中加入氯离子, 使系统呈电中性。使用最陡梯度法进行能量最小化计算, 之后进行正则系综 (canonical ensemble, NVT) 与等温等压系综 (constant-pressure, constant-temperature, NPT) 结构限制性运动, 所有计算均经历 100 ps。体系 MD 模拟经历 10 ns 后进行分子动力学计算分析。POPC 和 POPG 是高纯度脂质模拟物, 其中 POPC 通常被用来模拟哺乳动物细胞膜, POPG 被用来模拟细菌细胞膜。采用已平衡 40 ns 的 POPC 和 POPG 膜体系<sup>[20]</sup>, 经历 1 ns 的模拟后进行分子动力学计算分析。

### 1.2.3 抗菌活性的测定

试验采用 MIC 测定法<sup>[21]</sup>。将不同浓度多肽稀释液与细菌悬浊液混合后, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 18–24 h 后用酶标仪测定  $OD_{492}$  条件下的吸光值。不含细菌的溶液为阴性对照组, 含有细菌的溶液为阳性对照组。

### 1.2.4 溶血活性的测定

试验采集健康捐献者 (方禹鑫) 的血液, 1 000 r/min 离心 5 min 后收集人红细胞 (hRBCs)。随后用 PBS 洗涤 3 次并重悬。将不同浓度的多肽稀释液与 hRBCs 混匀, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 1 h。再将孵育后的 hRBCs 在 4  $^{\circ}\text{C}$  离心

(1 000 r/min) 10 min 后测定  $OD_{570}$  条件下的吸光值。不含多肽的 hRBCs 为阴性对照组, 经 0.1% Triton X-100 处理的 hRBCs 为阳性对照组。

### 1.2.5 细胞毒性的测定

将冻存于液氮中的鼠巨噬细胞 RAW264.7 (中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所) 复苏后参照 Wang 等的方法测定细胞毒性<sup>[21]</sup>。简单来讲, 将细胞混悬液与不同浓度的多肽溶液混合, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  下孵育 4 h, 加入 5 mg/mL 的 MTT 后继续孵育 4 h, 结束后弃掉上清液。用 100  $\mu\text{L}$  DMSO 溶解孔底结晶后使用酶标仪测定  $OD_{570}$  下的吸光值。不加多肽的试验孔为阴性对照。

### 1.2.6 盐离子稳定性的测定

根据文献参考方法<sup>[22]</sup>, 将不同浓度多肽溶液与细菌悬浊液混合, 在不同的生理盐浓度 (NaCl (150 mmol/L)、KCl (4.5 mmol/L)、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  (6  $\mu\text{mol/L}$ )、 $\text{ZnCl}_2$  (8  $\mu\text{mol/L}$ )、 $\text{CaCl}_2$  (2 mmol/L)、 $\text{MgCl}_2$  (1 mmol/L) 和  $\text{FeCl}_3$  (4  $\mu\text{mol/L}$ )) 下按照 1.2.3 的方法测定抗菌肽在盐离子溶液中的 MIC 值。

### 1.2.7 血清、pH 稳定性的测定

为了检测血清是否会对抗菌肽的稳定性产生影响, 将待测药物分别与 50%、25% 和 12.5% 的胎牛血清在 37  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 4 h。评估抗菌肽在不同 pH 环境下的稳定性, 将多肽与 PBS (pH 为 2 或 12) 于 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 4 h。然后按照 1.2.4 的方法测定这些肽的 MIC。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗菌肽的设计

抗菌肽的结构和关键的物理化学参数如图 1 和表 1 所示。通过 CCS<sup>[23]</sup> 计算出 RIKL 的疏水值为 1.12。肽的理论分子量值与测量的分子量值一致且所有化合物纯度达到 95% 以上, 表明多肽被成功合成。

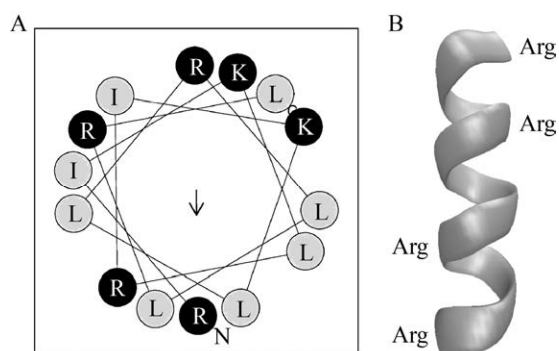


图 1 RIKL 的 (A) 螺旋轮示意图 (B) 三维结构投影图 (精氨酸分布在螺旋外侧)

Figure 1 RIKL's (A) schematic diagram of the spiral wheel and (B) 3D structure projection (arginine is distributed outside the spiral).

## 2.2 二级结构的测定

CD 光谱可以检测抗菌肽在不同溶液中的二级结构。RIKL 在 10 mmol/L PBS 和 50% TFE 溶液中的 CD 光谱如图 2 所示。RIKL 在 10 mmol/L PBS 中约在 200 nm 处呈现一个最小负峰,证明了 RIKL 在 PBS 中呈现无规则卷曲结构。在 50% TFE 溶液中,RIKL 的光谱特征显示在约 207 nm 和 226 nm 附近均出现两个负峰,这证明了 RIKL 在模拟疏水环境中形成  $\alpha$ -螺旋结构。

## 2.3 分子动力学分析

为了评价 RIKL 在水溶液中的稳定性,对 RIKL 在水溶液进行了 10 ns 的分子动力学模拟。三维构象结果如图 3 所示,RIKL 在经历 10 ns 后,大部分残基能保持螺旋结构。根均方偏差 RMSD 显示在 10 ns 的模拟过程中,整个

骨架处于持续的偏移状态。RIKL 的二级结构变化表明  $\alpha$ -螺旋的残基数量由最初 0–2 ns 的 10 个降低至 7 个。RIKL 在与膜体系 POPC 和 POPG 模拟 1 ns 后,如图 3D 所示,通过 RIKL 与 POPC 和 POPG 形成氢键的情况可以看出 RIKL 在两种膜环境下接触程度基本一致,但 RIKL 与 POPG 形成氢键的数量明显多于 POPC。通过 RIKL 与两种膜模拟后二级结构的变化可以看出,在 POPC 中  $\alpha$ -螺旋含量急剧下降,而在 POPG 中能维持其二级结构。

## 2.4 抑菌活性

如表 2 所示,RIKL 对革兰氏阴性菌的 MIC 值为 2,对革兰氏阳性菌的 MIC 值在 2–8 之间。根据治疗指数 (TI) 发现 RIKL 的 TI 值 (82.6) 较高,是蜂毒素的 TI 值 (0.1) 的 826 倍,且与抗生素环丙沙星的效价一致。因此,RIKL 具有较高的细胞选择性和广谱抗菌活性。

## 2.5 溶血活性

如图 4 所示,在浓度为 128  $\mu\text{mol/L}$  时,没有检测到 RIKL 的溶血活性。蜂毒素在浓度为 16  $\mu\text{mol/L}$  时溶血率超过 80%,RIKL 即便在最高浓度下也没有造成红细胞溶血。这表明 RIKL 相比蜂毒素具有较高的生物相容性。

## 2.6 细胞毒性

采用 MTT 法检测抗菌肽 RIKL 对鼠巨噬细胞 RAW264.7 的毒性。结果如图 5 所示,RIKL 处理后,细胞存活率高于 80%,在高浓度 128  $\mu\text{mol/L}$  处,RIKL 并未引起真核细胞毒性,

表 1 RIKL 设计和关键物理化学参数

Table 1 Design of RIKL and key physicochemical parameters

Peptides	Sequences	Chemical formula	Theoretical molecular weight	Measured molecular weight	Charge	Hydrophobicity	Hydrophobic moment
RIKL	RIKLRIKLLRLLRL-NH <sub>2</sub>	C <sub>86</sub> H <sub>164</sub> N <sub>28</sub> O <sub>16</sub>	1 804.36	1 804.36	+7	1.12	1.62
ME	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	C <sub>131</sub> H <sub>228</sub> N <sub>38</sub> O <sub>32</sub>	2 845.73	2 847.44	+5	-0.01	3.04

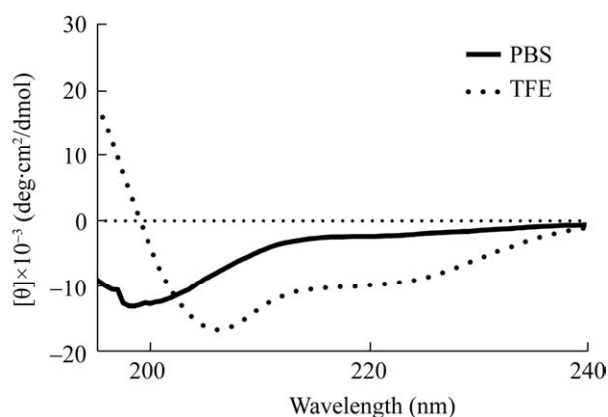


图2 抗菌肽 RIKL 的 CD 光谱

Figure 2 CD spectrum of RIKL.

而蜂毒素在  $2 \mu\text{mol/L}$  处的细胞存活率不足 80%。

## 2.7 盐离子稳定性

血液中盐离子的浓度会对抗菌肽的稳定性造成不同程度的影响, 因此我们测试了在生理盐浓度下不同盐离子对 RIKL 和对照肽蜂毒素的最小抑菌浓度, 结果如表 3 所示。在  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  中, RIKL 对 *E. coli* ATCC 25922 的抑菌活性有所降低。对于 *S. aureus* ATCC 29213, 在  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  中, RIKL 的活性有所降低, 特别是在  $\text{Na}^+$  中, 活性降低较为明显, 而其他盐离子对 RIKL 的稳定性没有影响。

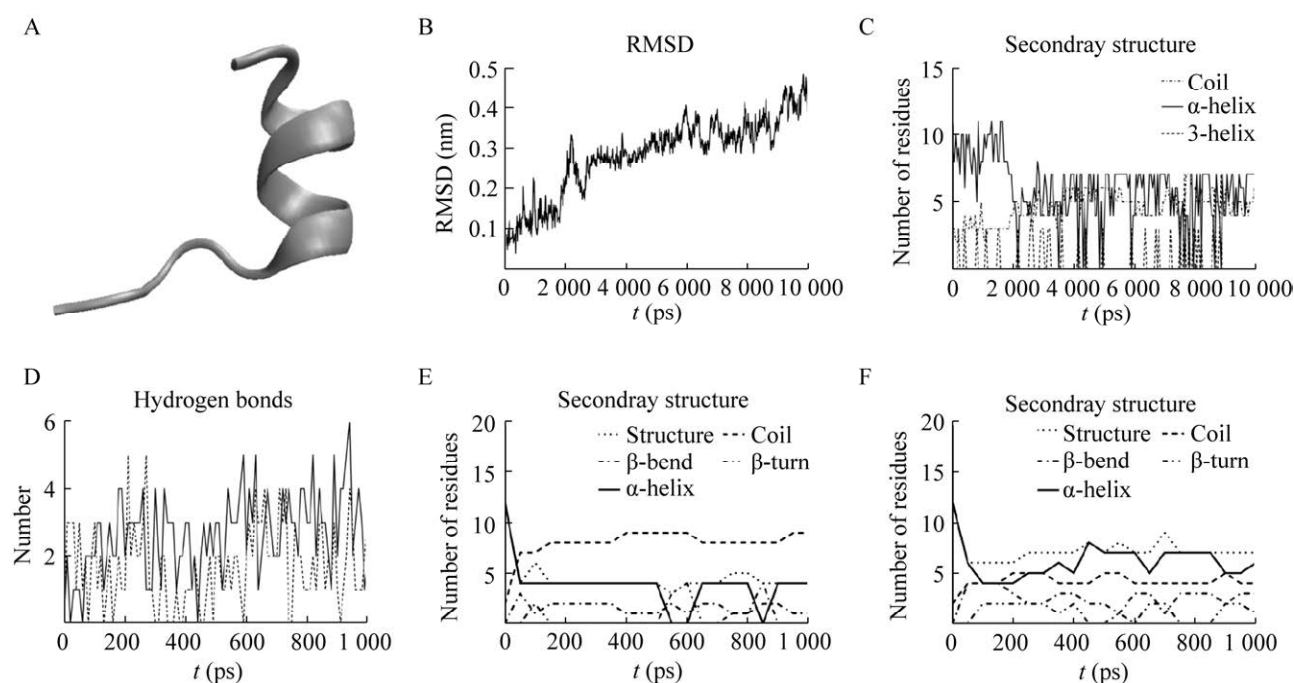


图3 经历 10 ns 模拟后 RIKL 的结果 A: 3D 图; B: 根均方偏差 RMSD 函数图; C: 二级结构变化; 1 ns 后膜蛋白体系中抗菌肽 RIKL; D: 与 POPG (实线)、POPC (虚线) 的氢键变化; E: 与 POPC 模拟后的二级结构变化; F: 与 POPG 模拟后的二级结构变化

Figure 3 After 10 ns simulation, RIKL's 3D diagram (A), RMSD function diagram of root mean square deviation (B), content change of secondary structure (C), hydrogen bond changes between RIKL (D), POPG (solid line) and POPC (dashed line) (E), secondary structure changes after POPC simulation (F), and secondary structure changes after POPG simulation.

表 2 RIKL 对革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌菌株的抑菌活性与溶血活性 ( $\mu\text{mol/L}$ )Table 2 Antibacterial activity and hemolytic activity of RIKL against gram-negative and gram-positive bacterial strains ( $\mu\text{mol/L}$ )

Peptides	Minimum inhibitory concentration (MIC) <sup>a</sup>										GM <sup>b</sup>	MHC <sup>c</sup>	TI <sup>d</sup>
	Gram-negative bacterial					Gram-positive bacterial							
	<i>E. coli</i> 25922	<i>S. typhimurium</i> 14028	<i>E. coli</i> UB1005	<i>E. coli</i> K88	<i>S. pullorum</i> 7913	<i>S. aureus</i> 29213	<i>S. aureus</i> 12228	<i>S. epidermidis</i> 63501	<i>B. subtilis</i> 25923	<i>S. aureus</i> 25923			
RIKL	2	2	2	2.0	2	4	4.0	2	8	8	3.10	256.00	82.6
Melititin	2	1	1	0.5	1	8	0.5	2	4	4	2.20	0.25	0.1
Ciprofloxacin	2	1	1	1.0	2	4	1.0	4	4	4	2.22	256.00	115.3

a: minimum inhibitory concentration (MIC) is the minimum concentration at which a peptide can inhibit bacterial growth; b: calculate the geometric mean value (GM) of MIC values for all bacterial strains of the peptide; c: MHC is the minimum hemolytic concentration causing 5% hemolysis of human red blood cells (hRBC); d: treatment index (TI) is the ratio of the geometric mean value of MHC to MIC (GM), the higher the value is, the greater the cell selectivity is.

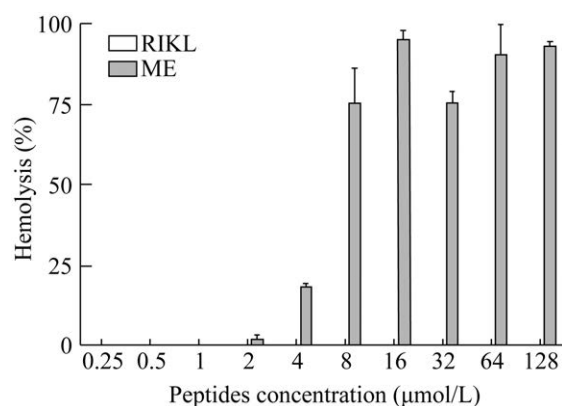


图 4 RIKL 对 hRBCs 的溶血活性

Figure 4 Hemolytic activity of RIKL against hRBCs.

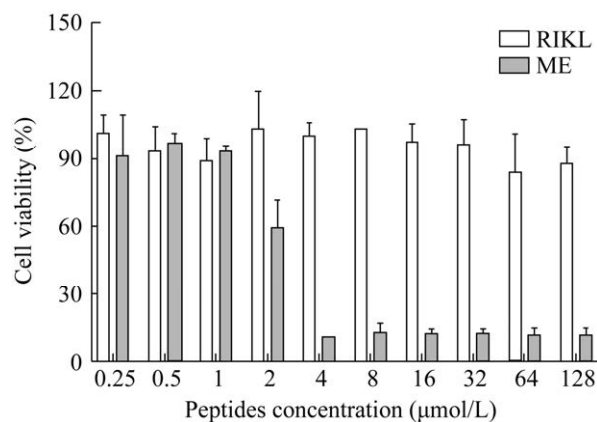


图 5 RIKL 对 RAW 264.7 的细胞毒性

Figure 5 Cytotoxicity of RIKL against RAW 264.7.

表 3 RIKL 的盐离子稳定性

Table 3 Salt ion stability of RIKL

Peptides	Minimum inhibitory concentration (MIC)							
	Control	NaCl	KCl	NH <sub>4</sub> Cl	MgCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	ZnCl <sub>2</sub>	FeCl <sub>3</sub>
<i>E. coli</i> ATCC 25922								
RIKL	2	4	2	1	4	8	2	2
Melittin	2	4	2	1	4	4	1	2
Ciprofloxacin	2	2	2	1	2	2	1	2
<i>S. aureus</i> ATCC 29213								
RIKL	4	32	8	4	4	8	2	4
Melittin	8	2	1	1	2	2	1	1
Ciprofloxacin	4	4	4	2	4	4	2	4

The MIC values (μmol/L) of the control group were determined in the absence of these physiological salts.

## 2.8 血清和 pH 值稳定性

为了评价抗菌肽在血清和在不同 pH 值下的稳定性, 将 RIKL 与不同浓度的血清和在不同 pH 值条件下孵育 4 h 并测定其最小抑菌浓度的变化。结果如图 6 所示, RIKL 在与 50% 血清孵育后相较于与 25% 和 12.5% 血清孵育后最小抑菌浓度有所下降。RIKL 在 pH 为 2.0 和 12.0 的条件下, 最小抑菌浓度略微下降。RIKL 在两种环境下仍然保持着较高的抗菌活性。

## 3 讨论

尽管抗菌肽被认为是宿主抵抗微生物攻击的第一道防线, 但其作为一类新型抗菌药物的有效性及安全性仍有待证明。到目前为止, 仅有少数几种抗菌肽被用于医疗领域。为了提高抗菌肽的抑菌活性, 降低其对动物血红细胞和正常组织细胞的毒副作用, 我们根据简化模板法成功设计出抗菌肽 RIKL。CD 光谱分析表明, 在模拟细菌细胞膜附近的疏水环境中, RIKL 显示出  $\alpha$ -螺旋结构。RIKL 对细菌膜的破坏能力可能是由于在细菌膜环境被诱导形成的  $\alpha$ -螺旋结构所提供的<sup>[24]</sup>。



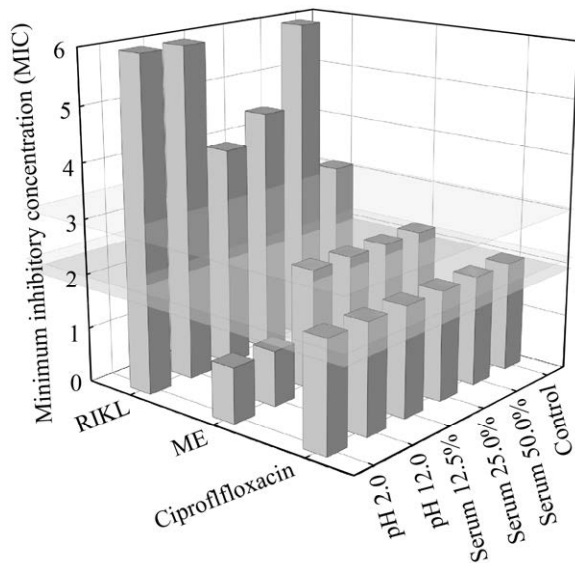


图6 RIKL在不同pH和血清处理后的最小抑菌浓度变化值

Figure 6 Change of the minimum inhibitory concentration of RIKL upon treatment with different pH and serum.

抗菌肽在溶剂中的稳定性是抗菌肽能够长期保存并发挥活性作用的前提。通过分子动力学分析可知,RIKL的二级结构在水溶液中发生了部分变化,头尾部的螺旋部分解体,但整体仍以 $\alpha$ -螺旋为主,RIKL的二级结构并没有因此而受到大量的破坏。根均方偏差RMSD结果显示在10 ns的模拟过程中,RIKL分子骨架处于持续的偏移状态,表明RIKL的构象在水溶液中会缓慢改变。以上结果表明,RIKL在水溶液中的构象会发生偏移,但仍然能保持其螺旋结构的稳定。为了从分子水平验证RIKL的抑菌活性和毒性,模拟了RIKL与POPC/POPG的相互作用<sup>[25]</sup>。通过RIKL在POPC和POPG中的构象差异可以看出,RIKL可以与POPG形成更多的氢键,而氢键数量的增加往往诱导细菌膜成孔并出现磷脂双分子层水通道<sup>[26]</sup>。

在一定范围内,抗菌肽疏水性的增加往往伴随着毒性的增高<sup>[27]</sup>。在本研究中,RIKL具有

与蜂毒素相似的高抗菌活性,但RIKL的溶血活性远低于蜂毒素。从结果中发现,RIKL和蜂毒素之间的重要区别在于正电荷数、疏水性和疏水力矩(表1)。因此可以推断RIKL的高抑菌活性来自它的高正电荷数(+7)和高疏水性,这也表明了肽的正电荷数和疏水性对其抑菌活性的高低有着重要影响<sup>[28]</sup>;亮氨酸与异亮氨酸的侧链伸展性和疏水性可以促进螺旋结构的形成<sup>[29]</sup>,而高螺旋度往往伴随着抑菌活性的提高<sup>[30]</sup>。由于抗菌肽与细菌的作用机制通常是利用正电性与细胞膜表面带负电的LPS(革兰氏阴性菌的脂多糖)或LTA(革兰氏阳性菌的脂磷壁酸)相吸引,并通过疏水作用瓦解细胞膜组分,造成细菌膜出现环状孔洞,细胞质外流而死亡<sup>[21,31]</sup>。因此,RIKL对革兰氏阴性和阳性菌均有不同程度的抑菌活性。肽的两亲性—即疏水力矩,是影响抗菌肽毒性的一个非常重要的因素,RIKL相较于蜂毒素的低疏水力矩可能是影响RIKL产生低溶血活性和低真核细胞毒性的重要原因<sup>[32]</sup>。同时,分子动力学也通过RIKL与POPC的氢键数量变化辅助预测了其对哺乳动物细胞膜活性较差。综上,RIKL具有与环丙沙星等效的抑菌活性和生物相容性。

体内多变的环境对抗菌肽的活性有很大的影响,主要的体内屏障包括盐离子、血清和pH值。因此,探究抗菌肽在不同浓度的盐离子、血清和不同pH值条件下的稳定性在生产和应用中有着重要意义。抗菌肽对细菌细胞膜的静电吸附作用会受到高浓度盐离子的影响,进而造成抗菌肽对细菌细胞膜的吸附作用减弱,从而降低了抗菌肽的杀菌能力。通过表3可以看出,RIKL在 $\text{Na}^+$ 和 $\text{Ca}^{2+}$ 存在时,抑菌活性会显著降低,而在 $\text{K}^+$ 存在下对金黄色葡萄球菌的活性有所影响,其他盐离子对于RIKL并无抑制作用。研究表明, $\text{Na}^+$ 和 $\text{Ca}^{2+}$ 不仅会阻碍抗菌肽

与细菌膜之间的静电相互作用<sup>[33]</sup>, 而且还会与肽竞争 LPS 的结合位点<sup>[34]</sup>, 这也是 RIKL 在  $\text{Na}^+$  和  $\text{Ca}^{2+}$  的存在下抑菌活性下降的原因。RIKL 在 50% 血清中的抑菌活性降低, 表明 RIKL 的抑菌活性受血清影响, 但仍然具有较高的抗菌活性。而蜂毒素在血清环境下显著降低了抑菌活性, 表明 RIKL 比蜂毒素具有更高的血清稳定性。抗菌肽在血清中可能会与白蛋白结合, 从而限制抗菌肽与细菌细胞膜的接触, 进而降低了抗菌肽的抑菌活性<sup>[35]</sup>。不同 pH 值对于抗菌肽的稳定性也有较大的影响<sup>[36]</sup>, 在饲料添加剂中抗菌肽经常会面临强酸或强碱的环境。结果发现, 极端 pH 并没有使 RIKL 失活, 而蜂毒素最小抑菌浓度降低, 这可能是由于在强酸或者强碱的环境下, 蜂毒素正电荷氨基酸侧链被质子化或去质子化, 进而影响了蜂毒素正电荷的含量并降低了蜂毒素的抑菌活性, 而抗生素环丙沙星在以上屏障下未检测到抗菌活性的丧失。因此, RIKL 在不同盐离子、血清和 pH 条件下仍然能保持其较高的抗菌活性和较高的稳定性。综上所述, 我们通过 CD 光谱、分子动力学模拟以及在不同环境下生物学活性的检测, 设计并构建了一条具有较高细胞选择性和稳定性的抗菌肽 RIKL, 该抗菌肽有潜力成为一种新型的饲用抗生素替代物。

## REFERENCES

- [1] Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. *PNAS*, 2015, 112(18): 5649-5654.
- [2] Shafee TMA, Lay FT, Phan TK, et al. Convergent evolution of defensin sequence, structure and function. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(4): 663-682.
- [3] Cole JN, Nizet V. Bacterial evasion of host antimicrobial peptide defenses. *Microbiol Spectr*, 2016, 4(1): 413-443.
- [4] Nakatsuji T, Gallo RL. Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. *J Invest Dermatol*, 2012, 132(3): 887-895.
- [5] Zhong G, Cheng J, Liang ZC, et al. Short synthetic beta-sheet antimicrobial peptides for the treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections. *Adv Healthc Mater*, 2017, 6(7): 1601134.
- [6] Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(3): 238-250.
- [7] Cao X, Wang Y, Wu C, et al. Cathelicidin-OA1, a novel antioxidant peptide identified from an amphibian, accelerates skin wound healing. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 943.
- [8] Wiradharma N, Sng MYS, Khan M, et al. Rationally designed alpha-helical broad-spectrum antimicrobial peptides with idealized facial amphiphilicity. *Macromol Rapid Commun*, 2013, 34(1): 74-80.
- [9] Rodriguez A, Villeags E, Satake H, et al. Amino acid substitutions in an alpha-helical antimicrobial arachnid peptide affect its chemical properties and biological activity towards pathogenic bacteria but improves its therapeutic index. *Amino Acids*, 2011, 40(1): 61-68.
- [10] Itoh H, Tokumoto K, Kaji T, et al. Development of a high-throughput strategy for discovery of potent analogues of antibiotic lysocin E. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2992.
- [11] Zeng P, Xu C, Cheng Q, et al. Phenol-soluble-modulin-inspired amphipathic peptides have bactericidal activity against multidrug-resistant bacteria. *ChemMedChem*, 2019, 14(16): 1547-1559.
- [12] Ren M, Cai S, Zhou T, et al. Isoleucine attenuates infection induced by *E. coli* challenge through the modulation of intestinal endogenous antimicrobial peptide expression and the inhibition of the increase in plasma endotoxin and IL-6 in weaned pigs. *Food Funct*, 2019, 10(6): 3535-3542.
- [13] Wang J, Dou X, Song J, et al. Antimicrobial peptides: promising alternatives in the post feeding antibiotic era. *Med Res Rev*, 2019, 39(3): 831-859.
- [14] Yang ST, Shin SY, Lee CW, et al. Selective cytotoxicity following Arg-to-Lys substitution in tritrypticin adopting a unique amphipathic turn structure. *FEBS Lett*, 2003, 540(1/3): 229-233.
- [15] Andr a J, M D, Martinez de Tejada G, et al. Rationale for the design of shortened derivatives of the NK-lysin-derived antimicrobial peptide NK-2 with improved activity against gram-negative pathogens. *J Biol Chem*, 2007, 282(20): 14719-14728.

- [16] Samal HB, Das JK, Mahapatra RK, et al. Molecular modeling, simulation and virtual screening of MurD ligase protein from *Salmonella typhimurium* LT2. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2015, 73: 34-41.
- [17] Khatami MH, Bromberek M, Saika-Voivod I, et al. Molecular dynamics simulations of histidine-containing cod antimicrobial peptide paralogs in self-assembled bilayers. *Biochim et Biophys Acta BBA-Biomembr*, 2014, 1838(11): 2778-2787.
- [18] Balakrishnan VS, Vad BS, Otzen DE. Novicidin's membrane permeabilizing activity is driven by membrane partitioning but not by helicity: a biophysical study of the impact of lipid charge and cholesterol. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 2013, 1834(6): 996-1002.
- [19] Makarewicz T, Kaźmierkiewicz R. Molecular dynamics simulation by GROMACS Using GUI plugin for PyMOL. *J Chem Inf Model*, 2013, 53(5): 1229-1234.
- [20] Kukol A. Lipid models for united-atom molecular dynamics simulations of proteins. *J Chem Theory Comput*, 2009, 5(3): 615-626.
- [21] Wang C, Shao C, Fang Y, et al. Binding loop of sunflower trypsin inhibitor 1 serves as a design motif for proteolysis-resistant antimicrobial peptides. *Acta Biomater*, 2021, 124: 254-269.
- [22] Zhu X, Shan A, Ma Z, et al. Bactericidal efficiency and modes of action of the novel antimicrobial peptide T9W against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(6): 3008-3017.
- [23] Liu Y, Xia X, Xu L, et al. Design of hybrid beta-hairpin peptides with enhanced cell specificity and potent anti-inflammatory activity. *Biomaterials*, 2013, 34(1): 237-250.
- [24] Park IY, Cho JH, Kim KS, et al. Helix stability confers salt resistance upon helical antimicrobial peptides. *J Biol Chem*, 2004, 279(14): 13896-13901.
- [25] Pandit G, Biswas K, Ghosh S, et al. Rationally designed antimicrobial peptides: insight into the mechanism of eleven residue peptides against microbial infections. *Biochim et Biophys Acta BBA-Biomembr*, 2020, 1862(4): 183177.
- [26] Pandit G, Ilyas H, Ghosh S, et al. Insights into the mechanism of antimicrobial activity of seven-residue peptides. *J Med Chem*, 2018, 61(17): 7614-7629.
- [27] Arouri A, Dathe M, Blume A. The helical propensity of KLA amphipathic peptides enhances their binding to gel-state lipid membranes. *Biophys Chem*, 2013, 180: 10-21.
- [28] Wang X, Junior JCB, Mishra B, et al. Arginine-lysine positional swap of the LL-37 peptides reveals evolutionary advantages of the native sequence and leads to bacterial probes. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2017, 1859(8): 1350-1361.
- [29] Blaber M, Zhang X, Matthews B. Structural basis of amino acid alpha helix propensity. *Science*, 1993, 260(5114): 1637-1640.
- [30] Takahashi D, Shukla SK, Prakash O, et al. Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity. *Biochimie*, 2010, 92(9): 1236-1241.
- [31] Dong N, Zhu X, Chou SL, et al. Antimicrobial potency and selectivity of simplified symmetric-end peptides. *Biomaterials*, 2014, 35(27): 8028-8039.
- [32] Pathak N, Salas-Auvert R, Ruche G, et al. Comparison of the effects of hydrophobicity, amphiphilicity, and alpha-helicity on the activities of antimicrobial peptides. *Proteins*, 1995, 22(2): 182-186.
- [33] Zhu X, Dong N, Wang Z, et al. Design of imperfectly amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides with enhanced cell selectivity. *Acta Biomater*, 2014, 10(1): 244-257.
- [34] Huang J, Hao D, Chen Y, et al. Inhibitory effects and mechanisms of physiological conditions on the activity of enantiomeric forms of an alpha-helical antibacterial peptide against bacteria. *Peptides*, 2011, 32(7): 1488-1495.
- [35] Nguyen LT, Chau JK, Perry NA, et al. Serum stabilities of short tryptophan-and arginine-rich antimicrobial peptide analogs. *PLoS One*, 2010, 5(9): e12684.
- [36] Thyab Gddoa Al-sahlany S, Altemimi A, Al-Manhel A, et al. Purification of bioactive peptide with antimicrobial properties produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Foods*, 2020, 9(3): 324.

(本文责编 陈宏宇)