

一组人工合成抗菌肽的研究

李国栋¹, 钱承军¹, 陆 敏¹, 孙睿华¹, 黄青山^{1, 2*}

(¹ 上海高科联合生物技术研发有限公司 上海 201206)

(² 复旦大学 生命科学院 遗传学研究所 遗传工程国家重点实验室 上海 200433)

摘 要 Cecropin A1 是一种从惜古比天蚕 (*Hyalophora cecropia*) 中提取的由 37 个氨基酸组成的一种 α -螺旋抗菌肽, 其杀菌活性较弱。本文采用了 cecropin A1 的 N 端 1-8 序列 KWKLFKKI, 另加一段标准的 α -螺旋结构序列, 然后用一个铰链结构 GIG 相连, 合成了 15 条抗菌肽。经过试验证明部分含有核心标准螺旋结构的序列, 对革兰氏阳性菌和阴性菌的最小抑菌浓度仅是原有 cecropin A1 抗菌肽的 1/100 左右。该类抗菌肽有希望进一步开发为新的抗感染药物。该类抗菌肽已经申请专利, 专利号为 PCT/ CN 03/00522。

关键词: 抗菌肽, 最小抑菌浓度, 多肽合成

中图分类号: Q936 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2006)03-0492-04

多细胞有机体在生存中不可避免的要接触大量的病原微生物, 在进化中它们发展了各自的保护机制: 防止微生物进入肌体表皮, 防止已经进入表皮的微生物的攻击。因此多细胞有机体能够产生不同的抗菌物质快速杀灭各种入侵微生物。其中抗菌肽是参与肌体防御的重要抗菌物质之一^[1-3]。

昆虫抗菌肽是昆虫体液免疫的重要组成部分, 目前已经在昆虫体内发现了上百种抗菌肽, 其中 Cecropin A (CA) 是昆虫抗菌肽中研究最早同时也是研究最多的一种抗菌肽。Cecropin A 是由 Boman 等从受刺激的惜古比天蚕 (*Hyalophora cecropia*) 的滞育蛹中分离出第一个昆虫抗菌肽, 含有 37 个氨基酸, 属于一种 α -螺旋抗菌肽。研究表明 CA 对多种革兰氏阳性菌和阴性菌有抑菌活性但对正常的真核细胞如红细胞没有毒性^[4-6]。但是天然存在的 CA 对细菌的杀灭作用较差, 很难达到药用的要求。

尽管到目前为止还没有对抗菌肽的作用机制有一个详细的了解, 但是许多试验表明, 抗菌肽是通过直接作用于微生物细胞膜上起作用^[7, 8]。首先带正电荷的多肽通过静电作用结合到带负电的磷脂膜上, 然后多肽与膜结合形成螺旋或折叠结构, 在细胞膜上形成离子通道或者裂解细胞膜, 进而杀死目标微生物。研究发现, 抗菌肽与脂质体作用, 若脂质体带电荷为负值, 抗菌肽就结合到膜上, 膜被破坏。如减少 N 端的螺旋, 则其膜的破坏力降低。用圆二色谱法研究了抗菌肽的高级结构, 发现抗菌肽在磷酸钠缓冲液中呈自由卷曲的构象, 而加入六氟丙醇降低溶液的极性以模拟细胞膜的疏水环境时, 抗菌肽的螺旋数量明显增加, 提示了分子中的 α -螺旋度与其杀菌活性密切相关^[9, 10]。本研究试图通过增加分子中 α -螺旋结构对 CA 抗菌肽进行改造以提高多肽的抗菌

活性。首先参照文献 [1] 采用了 cecropin A1 的 N 端 1-8 序列 (KWKLFKKI), 另外加了一段标准的 α -螺旋结构序列 (碱性氨基酸-疏水性氨基酸-疏水性氨基酸-碱性氨基酸的重复序列), 然后用一个铰链结构 GIG 相连, 合成了 15 条抗菌肽。经过试验证明部分含有核心标准螺旋结构的序列其抗菌活性远远好于 CA, 部分经过改造后的序列可以进一步开发为治疗耐药菌感染的药物, 相关临床前的有效性和安全性实验工作正在进行。同时该实验进一步验证了抗菌肽序列中螺旋结构对杀菌活性有重要的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 检测抗菌肽活性所用的菌种购于中国药监局菌种中心和中国科学院微生物研究所菌种中心, 分别为: 革兰氏阳性菌: 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) CMCC26003, 枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) DB430, 短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) CMCC63202, 溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*) S1.634, 藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) CMCC28001; 革兰氏阴性菌: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) ATCC8099, 肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) CMCC46117, 乙型副伤寒沙门氏菌 (*Salmonella paratyphi-B*) CMCC50094, 绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) CMCC10104。

1.1.2 培养基: 菌种生长和药敏检测用营养肉汤培养基 (Nutrient broth medium) 购于上海市生化试剂商店。

1.1.3 主要试剂和仪器 Pioneer 多肽合成仪购于美国 ABI 公司, gold system HPLC 购于美国 Beckman coulter 公司, 冷冻干燥为德国 Christ 产品, Bio-rad 550 酶标仪购于 Bio-rad 公司。合成抗菌肽所用保护氨基酸、树脂、DMF、哌啶等均购于 ABI 公

基金项目: 上海市重点科技攻关项目 (044319223)

* 通讯作者。Tel: 86-21-65642814; E-mail: qshuang@fudan.edu.cn

作者简介: 李国栋 (1973 -) 男, 山西朔州人, 工程师, 硕士, 主要从事生物活性多肽的研究。E-mail: Jieguod@yahoo.com.cn

其他作者: 黄 芳¹

收稿日期: 2005-08-08; 接受日期: 2005-09-08; 修回日期: 2006-02-27

司,剪切所用试剂购于 Fluka 公司,纯化所用试剂购于德国 Merck 公司,Cecropin A1 和 Magainin II 购于 sigma 公司。其它试剂购于上海生化试剂商店。

1.2 抗菌肽的设计

研究表明 Cecropin A 对细菌的杀灭作用较差,很难达到药用的要求。本文在 cecropin A1(KWKLFFKKIEKVGQNIIRDG II KAGPAVAVVGGQATQIAK-NH₂^[12])序列的基础上,采用其 N 端 1-8 序列 KWKLFFKKI,在此基础上,另加一段标准的 α-螺旋结构序列,中间用一个铰链结构 GIG 相连。设计合成了 15 条抗菌肽(表 1)。

表 1 修饰改造后的抗菌肽序列

Table 1 Sequences of modified antimicrobial peptide

Name	Sequence
Gk-1	KWKLFFKIGIGKVLKVKLKKVLK
Gk-2	KWKLFFKIGIGKLFKFLKFLK
Gk-3	KWKLFFKIGIGKILKILKILKILK
Gk-4	KWKLFFKIGIGKLLKLLK
Gk-5	KWKLFFKIGIGKAAKAAKAAK
Gk-6	KWKLFFKIGIGKGLKGLK
Gk-7	KWKLFFKIGIGRILFRILFRILFR
Gk-8	KWKLFFKIGIGRIIRIIRIIR
Gk-9	KWKLFFKIGIGRAARRAARRAAR
Gk-10	KWKLFFKIGIGRILRILRILRILR
Gk-11	KWKLFFKIGIGRVLRRVLR
Gk-12	KWKLFFKIGIGRLKGLKGLK
Gk-13	KWKLFFKIGIGRVRRVVR
Gk-14	KWKLFFKIGIGRAFRRFRFR
Gk-15	KWKLFFKIGIGRFRFRFR

1.3 抗菌肽的合成和纯化(以制备 0.1mmol 的 GK-1 为例)

1.3.1 抗菌肽的合成:新设计的抗菌肽序列经过固相合成多肽的方法合成。合成反应从 C 端到 N 端逐个进行,由合成仪自动控制。首先称量 0.1mmol 的结合了第一个氨基酸即 Lys 的树脂(购于美国应用生物系统公司)装柱,再用 20% 哌啶二甲基甲酰胺溶液脱保护,二甲基甲酰胺清洗,9-芴甲氧羰基(Fmoc)保护的游离氨基酸溶解于并啶并三氮唑四甲基六氟磷酸盐(HATU)二异丙基乙基胺(DIPEA),溶解后的溶液在柱上循环偶合反应 30min,二甲基甲酰胺清洗重复以上脱保护到偶合反应步骤直到制备结束。

1.3.2 合成后的多肽的制备和分析:取下反应后的树脂,加入剪切液 5ml(88% 三氟乙酸,5% 苯酚,5% 水,2% 三异丙基硅烷)室温反应 2h,过滤,滤出液中加入 10 倍体积的预冷无水乙醚(-20℃)50mL,4000r/min 离心 10min,收集沉淀。用预冷无水乙醚洗涤沉淀 3 次后室温干燥。

称量一定量干燥后的多肽,溶于 0.1% 三氟乙酸,样品经过孔径为 0.22μm 的滤膜过滤后,经 C18 反向柱(25 × 250mm,10μm,100A)分离(洗脱液为:A:含 0.1% 三氟乙酸的水溶液,B:含 0.1% 三氟乙酸的乙腈溶液;洗脱条件为 0 ~ 60% B30min)收集洗脱峰,冷冻干燥^[13]。干燥后多肽再经过半制备柱分离(10mm × 250mm,5μm,100A,)后冷冻干燥。二次纯化后的多肽经过分析柱(4.6mm × 250mm,5μm,100A,

Beckman coulter)鉴定其纯度,经过 LC/MS 检测其分子量。

1.4 96 孔板法检测抗菌肽的最小抑菌浓度

菌种复苏,接种斜面于 37℃ 培养过夜,细菌在 LB 培养基中生长至对数中期,经过 LB 培养基逐级稀释后,稀释到细菌浓度为 10⁴ ~ 10⁵ CFU/mL,按每孔 100μL 菌液接种于 96 孔板中,将多肽以一定比例稀释后,每孔中加入 10μL。将 96 孔板置于 37℃ 培养过夜,酶标仪检测 OD₆₂₀ 值^[13]。以天然抗菌肽 cecropin A1, magainin 为对照。计算细菌的存活率和抑菌率。

存活率% = OD₆₂₀(加入抗菌肽的吸收值) / OD₆₂₀(不加抗菌肽的吸收值)

抑菌率% = 1 - 存活率%

最小抑菌浓度定义为抑菌率% ≥ 80% 的抗菌肽的浓度。

1.5 抗菌肽的杀菌动力学曲线检测

抗菌肽的杀菌动力学曲线用金黄色葡萄球菌、大肠杆菌检测。细菌在 MH 培养基中生长至对数中期,经过 MH 培养基逐级稀释后,浓度为 1 × 10⁵ ~ 5 × 10⁵ CFU/mL。取无菌试管,先加入 0.5mL 3% 牛血清白蛋白溶液,再加入 0.5mL 实验用菌悬液,混匀后再加入样品 4.0mL,迅速混匀并立即计时。待细菌与抗菌肽相互作用至各预定时间,分别吸取 0.5mL 混合液加于 4.5mL 经灭菌的中和剂中混匀,作用 10min 后,分别吸取 0.5mL 样液,按活菌培养计数方法测定存活菌数,每管接种两皿。同时用稀释液代替测试样品,进行平行实验,做为阳性对照。所有实验样本均在 36℃ 温箱中培养,对细菌繁殖体培养 48h 观察结果,对细菌芽孢或真菌繁殖体培养 72h 观察最终结果。杀菌动力学曲线为存活率 - 培养时间。

2 结果

2.1 抗菌肽的合成、纯化和分子量确证

本文设计的抗菌肽经过合成和纯化后,冻干的抗菌肽经过 HPLC 检测其纯度达到 96% 以上,检测结果见图 1。经过质谱检测后证明合成的抗菌肽的分子量与理论分子量完全一致为 2934.0,证明制备的多肽即为设计的 GK-8 抗菌肽,检测结果见图 2。

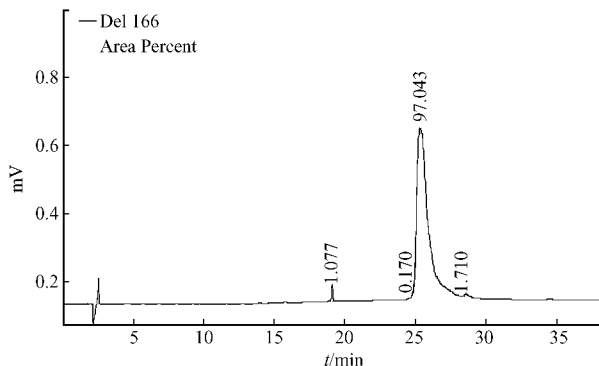


图 1 抗菌肽 GK-8 的纯度检测结果

Fig.1 HPLC analysis of antimicrobial peptide GK-8.

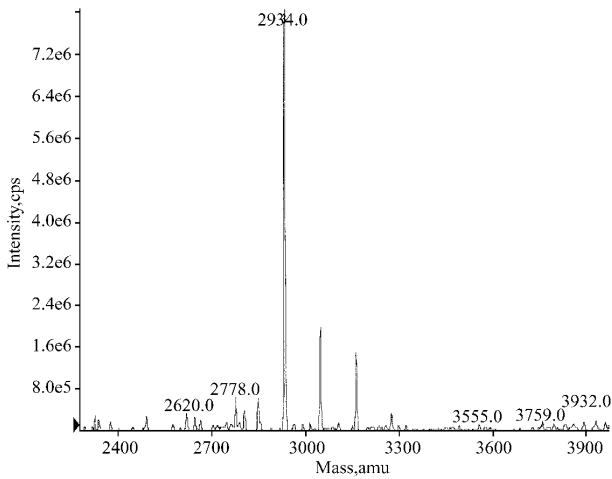


图2 抗菌肽 GK-8 的分子量检测结果

Fig.2 Mass spectrometry (EI-MS) analysis of antimicrobial peptide GK-8.

表2 15条抗菌肽对几种细菌的最小抑菌浓度(MIC)的比较

Table 2 The minimal inhibitory concentration (MIC, $\mu\text{g/mL}$) of 15 antimicrobial peptides on nine strains of bacteria

Antimicrobial peptide	Strains								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Gk-1	0.25	0.50	2.00	0.50	1.00	2.00	2.00	2.00	8.00
Gk-2	0.25	1.00	1.00	0.50	2.00	0.50	2.00	2.00	4.00
Gk-3	0.50	1.00	4.00	1.00	4.00	0.25	4.00	8.00	8.00
Gk-4	2.00	0.50	8.00	4.00	4.00	8.00	16.00	16.00	16.00
Gk-5	16.00	16.00	8.00	16.00	8.00	32.00	50.00	50.00	> 50.00
Gk-6	4.00	8.00	2.00	2.00	1.00	16.00	32.00	16.00	> 50.00
Gk-7	1.00	0.50	0.25	0.50	0.50	2.00	2.00	1.00	8.00
Gk-8	0.25	0.50	0.50	1.00	2.00	1.00	2.00	2.00	8.00
Gk-9	8.00	8.00	16.00	32.00	16.00	16.00	32.00	50.00	> 50.00
Gk-10	0.25	0.50	1.00	1.00	2.00	0.50	1.00	2.00	4.00
Gk-11	0.50	0.50	1.00	2.00	1.00	4.00	4.00	2.00	8.00
Gk-12	2.00	8.00	1.00	2.00	4.00	16.00	8.00	4.00	32.00
Gk-13	2.00	2.00	2.00	4.00	1.00	8.00	4.00	4.00	8.00
Gk-14	0.50	0.5	1.00	0.25	1.00	4.00	1.00	4.00	16.00
Gk-15	1.00	0.25	0.50	0.25	1.00	0.50	4.00	4.00	32.00
cecropin A1	25.00	> 50.00	50.00	> 50.00	50.00	25.00	25.00	50.00	> 50.00
magainin	50.00	> 50.00	> 50.00	50.00	50.00	25.00	50.00	> 50.00	> 50.00

1. *Staphylococcus aureus* CMCC26003 ;2. *Bacillus subtilis* DB430 ;3. *Bacillus pumilus* CMCC63202 ;4. *Micrococcus lysodeikticus* SI.634 ;5. *Micrococcus luteus* CMCC28001 ;6. *Escherichia coli* ATCC8099 ;7. *Klebsiella pneumoniae* CMCC46117 ;8. *Salmonella paratyphi-B* CMCC50094 ;9. *Pseudomonas aeruginosa* CMCC10104.

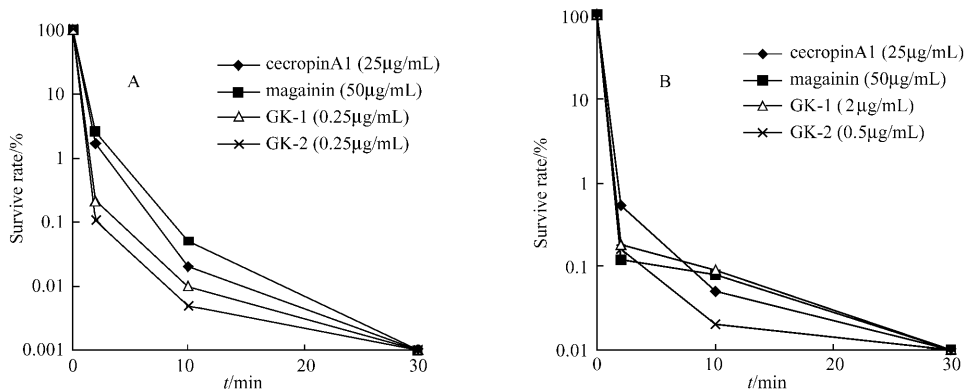


图3 4种抗菌肽对金黄色葡萄球菌(A)和大肠杆菌(B)的杀菌动力学曲线

Fig.3 Kinetics of killing of *Staphylococcus aureus* (A) and *E. coli* (B) by four peptides.

3 讨论

研究表明线性抗菌肽的正电荷含量、疏水性和螺旋结构对抗菌肽的活性是至关重要的^[14,15]。在模拟膜的疏水环境

2.2 抗菌肽的抑菌活性检测

实验结果(表2)表明,经过修饰改造的抗菌肽对5种革兰氏阳性菌和4种革兰氏阴性菌的抗菌活性明显优于 Cecropin A1 和 magainin。

2.3 抗菌肽的杀菌动力学曲线检测

实验结果表明 GK-1 和 GK-2 分别以 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 终浓度作用于金黄色葡萄球菌 CMCC26003,以 2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 终浓度作用于大肠杆菌 ATCC8099 后,其在不到 2min 即可杀死近 99% 的细菌,与 Cecropin A1 以 25 $\mu\text{g/mL}$ 、magainin2 以 50 $\mu\text{g/mL}$ 和 25 $\mu\text{g/mL}$ 终浓度的杀菌时间基本相同,杀菌非常迅速。但是后两种抗菌肽的杀菌浓度约为 GK-1 和 GK-2 抗菌肽的 100 倍。结果显示这四种抗菌肽可能有相同的杀菌机理,都可能是通过裂解细菌细胞膜起作用,GK1、GK2 抗菌肽有更强的杀菌活性。杀菌动力学曲线见图3。

下,分子中的 α -螺旋度与其杀菌活性密切相关^[8-11,16-18]。本文尝试了正电荷增加的几条多肽,结果表明单纯增加正电荷并不能提高多肽的抗菌活性(数据未公布)。在随后的研究中,试图通过增加 Cecropin A1 分子中 α -螺旋结构对抗菌肽讲

行改造,在CA的基础上,增加了一段标准的 α -螺旋结构后,结果表明经过改造后的部分抗菌肽的杀菌活性是Cecropin A1的50~100倍。证明螺旋结构对抗菌肽的活性很重要,与文献报道基本一致。但同时发现,并不是所有的含有核心序列的多肽的杀菌活性都相似,如RAAR其抗菌活性显著低于另外几种抗菌肽,是否暗示了单纯添加螺旋结构的序列也并不一定能增加抗菌活性,可能与氨基酸的疏水能力,形成螺旋结构的构象有一定的关系。

抗生素的耐药性、副作用、滥用、残留等问题已经是世界性的重大难题,寻找高效、广谱、无残留、无耐药性、低副作用的抗生素代用品,是近些年来人们一直努力的目标。抗菌肽因为其独特的性质和抗菌机理,很有可能成为新一代的抗生素。抗菌肽有独特的结构序列、作用机理和高效的杀菌效果,使得其不同于传统的抗生素,不易产生耐药性,同时和传统的抗生素基本没有交叉耐药现象。有着广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Ganz T, Lehrer RI. Antimicrobial peptides of vertebrates. *Cur Opin Immunol*, 1998, **10** :41-44.
- [2] HANCOCK REW, CHAPPLE DS. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, **43** :1317-1323.
- [3] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 2002, **415** :389-395.
- [4] Steiner H, Hultmark D, Engstrom A, et al. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 1981, **292** :246-248.
- [5] Hoffmann JA. Innate immunity of insects. *Cur Opin Immunol*, 1995, **7** :4-10.
- [6] Oren Z, Shai Y. Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 1998, **47** :451-463.
- [7] Sitaram N, Nagaraj R. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1462** :29-54.

- [8] Dathe M, Schumann M, Wieprecht T, et al. Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes. *Biochemistry*, 1996, **35** :12612-122.
- [9] Nakajima Y, Qu X, Natori S. Interaction between liposomes and sarcotoxin IA, a potent antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *J Biol Chem*, 1987, **262** :1665-1669.
- [10] Dathe M, Wieprecht T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1462** :71-87.
- [11] SCOTT MG, YAN H, HANCOCK RW. Biological Properties of Structurally Related α -Helical Cationic Antimicrobial Peptides. *INFECT IMMUN*, 1999, **67** :2005-2009.
- [12] Boman HG, Hultmark D. Cell free immunity in insects. *Annu Rev microbial*, 1987, **41** :103-126.
- [13] PARK IY. Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H₂A in the catfish, *Parasilurus asotus*. *FEBS Lett*, 1998, **437** :258-262.
- [14] Dathe M, Wieprecht T, Nikolenko H, et al. Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS Lett*, 1997, **403** :208-212.
- [15] Sitaram N, Nagaraj R. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1462** :29-54.
- [16] Kwon MY, Hong S, Lee KH. Structure-activity analysis of brevinin 1E amide, an antimicrobial peptide from *Rana esculenta*. *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1387** :239-248.
- [17] Oh JE, Lee KH. Characterization of the unique function of a reduced amide bond in a cytolytic peptide that acts on phospholipid membranes. *Biochem J*, 2000, **352** :659-666.
- [18] Oren Z, Shai Y. Selective lysis of bacteria but not mammalian cells by diastereomers of melittin: structure-function study. *Biochemistry*, 1997, **36** :1826-1835.

A group of synthetic antimicrobial peptides

LI Guo-dong¹, QIAN Cheng-jun¹, LU Min¹, SUN Rui-hua¹, HUANG Qing-shan^{1,2*}

(¹ Shanghai Hi-Tech United Bio-Technological Research&development Co., Ltd., Shanghai 201206, China)

(² State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Genetics, college of life science, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Cecropin A1 (CA), first found in the diapause pupa of *Hyalophora cecropia*, is an α -helix antimicrobial peptide. It has suppressive effect on several strains of bacteria but its effect is moderate. Therefore it is imperative to find new peptides of high lethality to pathogenic bacteria. The structure of CA was modified by increasing its α -helix number to improve the antimicrobial activity on the basis of previous works that there is a close relationship between the α -helix status of peptide and its antimicrobial activity. Fifteen peptides (GK1-GK15) containing the 1st to 8th amino acids (KWKLFKKI) at N terminus of CA linking with a typical α -helix structure by GIG hinge were synthesized. Purity (97%) of GK-8 was confirmed by HPLC and molecular weight (2934.0 Da) was measured by mass spectrometry. Minimum inhibitory concentration (MIC, $\mu\text{g}/\text{mL}$) was used to compare their killing efficiency on various bacteria both Grams-positive and Grams-negative. The results showed the killing efficiency of the modified peptides (GK-1, GK-2, GK-8, GK-10) on various bacteria were much more effective than the original and their MICs were only one percent (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of CA and magainin. It indicates that typical core α -helix of the peptides is essential for their lethality to pathogens and some of modified peptides can serve as attractive candidates for antimicrobial drug discovery. The patent number is PCT/ CN 03/00522.

Keywords: Antimicrobial peptide; The minimal inhibitory concentration (MIC); Peptide synthesis

Foundation item: Shanghai Key Technologies R&D Program (044319223)

* Corresponding author. Tel: 86-21-65642814, E-mail: qshuang@fudan.edu.cn

Other author: HUANG Fang¹

Received: 8 August 2005/Accepted: 8 September 2005/Revised: 27 February 2006