



一种源自人 α -2-巨球蛋白的抗菌肽 A2M3 及其对金黄色葡萄球菌的抑菌机制

范学楠¹, 林蓉^{1,2,3*}, 金日天^{1,2,3}, 梁铎^{1,3}, 邱绪健^{1,3}, 杨燊^{1,2,3*}

1 集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021

2 集美大学 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建 厦门 361021

3 大连工业大学 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心, 辽宁 大连 116034

范学楠, 林蓉, 金日天, 梁铎, 邱绪健, 杨燊. 一种源自人 α -2-巨球蛋白的抗菌肽 A2M3 及其对金黄色葡萄球菌的抑菌机制[J]. 微生物学报, 2024, 64(3): 938-952.

FAN Xuenan, LIN Rong, JIN Ritian, LIANG Duo, QIU Xujian, YANG Shen. A novel antimicrobial peptide A2M3 derived from human alpha-2-macroglobulin inhibits *Staphylococcus aureus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(3): 938-952.

摘要:【目的】在人的鼻腔中鉴定出一种源自 α -2-巨球蛋白的抗菌肽(命名为 A2M3), 并探究其对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的抑菌作用和机制。【方法】结合生物信息学技术对人类鼻液的质谱结果进行分析, 并筛选潜在抗菌肽; 通过微量稀释法和平板涂布法分别分析 A2M3 对金黄色葡萄球菌最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)和时间杀伤曲线(time-kill curve); 采用透射电镜、碘化丙锭(propidium iodide, PI)摄取实验、流式细胞术和核酸蛋白质泄露实验分析 A2M3 对金黄色葡萄球菌膜完整性、膜通透性的影响; 通过凝胶阻滞实验和荧光光谱实验探究 A2M3 对金黄色葡萄球菌基因组 DNA 的影响。【结果】利用生物信息学技术筛选出源自 α -2-巨球蛋白的潜在抗菌肽 A2M3, 其对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 125.0 μ g/mL, 且能在 3 h 内完全杀灭细菌。A2M3 通过增加细胞膜的通透性, 促使核酸和蛋白质泄露, 继而穿过细胞膜嵌入 DNA 的碱基对, 影响细菌的基因功能, 从而导致菌体死亡。【结论】A2M3 对金黄色葡萄球菌的抑菌机制涉及多靶点协同作用, 能够改变细菌细胞膜的通透性, 影响细菌的基因功能。这一发现揭示了从人体体液中筛选和分离抗菌功能肽的潜在应用价值。

关键词: 鼻腔; α -2-巨球蛋白; 金黄色葡萄球菌; 抗菌肽; 抑菌机制

资助项目: 福建省高校产学合作项目(2023N5008); 厦门市科技补助项目(2023CXY0305)

This work was supported by the Fujian Provincial Department of Science and Technology (2023N5008) and the Xiamen Science and Technology Subsidy Project (2023CXY0305).

*Corresponding authors. E-mail: LIN Rong, linrong@jmu.edu.cn; YANG Shen, yangshen@jmu.edu.cn

Received: 2023-10-17; Accepted: 2023-12-20; Published online: 2023-12-25

A novel antimicrobial peptide A2M3 derived from human alpha-2-macroglobulin inhibits *Staphylococcus aureus*

FAN Xuenan¹, LIN Rong^{1,2,3*}, JIN Ritian^{1,2,3}, LIANG Duo^{1,3}, QIU Xujuan^{1,3}, YANG Shen^{1,2,3*}

1 College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, Fujian, China

2 Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, Fujian, China

3 Collaborative Innovation Center for Key Technologies of Deep Processing of Marine Food, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China

Abstract: [Objective] To study the inhibitory effect and mechanism of an antimicrobial peptide (A2M3) derived from alpha-2-macroglobulin identified in the human nasal cavity against *Staphylococcus aureus*. [Methods] The mass spectrometry results of the human nasal liquid were analyzed, on the basis of which bioinformatic tools were used for the screening of potential antimicrobial peptides. The minimum inhibitory concentration (MIC) and time-kill curve of A2M3 against *S. aureus* were determined by the microdilution method and plate colony counting method. Then, transmission electron microscopy, PI uptake assay, flow cytometry, and determination of nucleic acid protein leakage were employed to study the effects of A2M3 on the membrane integrity and permeability of *S. aureus*. Finally, the effect of A2M3 on the genomic DNA of *S. aureus* was investigated by the gel retardation assay and fluorescence spectroscopy. [Results] A2M3 showed an MIC of 125.0 µg/mL against *S. aureus* and killed the bacteria completely within 3 h. A2M3 increased the cell membrane permeability to penetrate into *S. aureus* cells, leading to leakage of nucleic acids and proteins as well as insertion into DNA base pairs to interfere with the gene function, resulting in the death of the cells. [Conclusion] The inhibitory mechanism of A2M3 against *S. aureus* involves multiple targets. The antimicrobial peptide alters the permeability of the bacterial cell membrane and affects the gene function, thus exerting the inhibitory activity. The findings reveal that antimicrobial peptides could be screened and isolated from human body fluids for potential application.

Keywords: nasal cavity; alpha-2-macroglobulin; *Staphylococcus aureus*; antimicrobial peptide; antibacterial mechanism

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是临床重要的革兰氏阳性菌,也是一种条件致病菌,它能够定殖在人和动物的皮肤表面和鼻黏膜,引起各种感染性疾病,如心内膜炎、败血症和坏死性肺炎^[1-2]。一般情况下,巨噬细胞和中

性粒细胞可以将金黄色葡萄球菌清除^[3],但细菌逃脱免疫清除后导致免疫细胞死亡,造成脓肿,并通过血液传播到其他免疫器官^[4-5]。因此,金黄色葡萄球菌的感染是一个高度动态的过程,能够广泛传播和反复转移^[6]。此外,金黄色葡萄球

菌是一种适应性很强的菌株,能够形成生物被膜,而生物被膜是造成气管插管和留置鼻饲管等生物材料污染并危及生命的主要原因^[7-8]。根据美国医院协会(American Hospital Association, AHA)的调查数据,美国每年因使用医疗器械而导致的医院感染会造成约 10 万人死亡,并造成 240 亿美元的经济损失^[9]。目前,针对金黄色葡萄球菌的感染有多种抗生素可供选择进行治疗,包括利福平、庆大霉素、万古霉素,但长期使用抗生素容易导致微生物产生耐药性^[10]。因此,寻找一种抑菌效果显著且安全无耐药性的新型方法,是现今社会所迫切需要的。

抗菌肽(antimicrobial peptide, AMPs)是一类广泛存在于自然界生物体中的小肽类物质,是机体先天免疫系统的重要组成部分^[11]。抗菌肽具有水溶性好、对高等动物毒性低、无耐药性等特点,被认为是抗生素的潜在替代品,在医药行业和食品添加剂等领域具有良好的应用前景^[12]。鼻腔是葡萄球菌主要的聚集地,如金黄色葡萄球菌和溶血性葡萄球菌^[13]。在正常情况下鼻腔中的葡萄球菌能与机体达到一个平衡的状态,其主要原因是机体能够分泌具有防御功能的因子,如溶菌酶、乳铁蛋白和分泌性白细胞蛋白酶抑制剂(secretory leukocyte protease inhibitor, SLPI)等抗菌多肽^[14]。宿主防御是鼻分泌物的一个突出功能^[15]。有研究发现,将阳离子抗菌多肽从鼻液中除去,会降低鼻液对大肠杆菌、单核细胞增生李斯特氏菌和铜绿假单胞菌的抑菌活性^[16]。事实上,鼻黏膜通过阳离子多肽能够直接对细菌的攻击作出反应,选择性破坏细菌细胞壁和膜,这可能也是当鼻内感染病原菌时机体保持健康的原因之一^[17]。

本研究从人体鼻液中鉴定出一种源自 α -2-巨球蛋白的肽(命名为 A2M3),并探索了它对鼻腔中常见金黄色葡萄球菌的抑菌活性和作用机

制,这些发现将促进抗菌肽的开发,以及其在医学和其他相关领域的潜在应用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) NBRC 100910 由本实验室收藏,在营养肉汤培养基中于 37 °C 生长;正常人肝细胞(LO2 细胞)从厦门大学生命科学学院获得,并在 37 °C 和 5% CO₂ 中培养;肽 A2M3 由北京中科亚光生物科技有限公司合成;营养肉汤培养基(nutrient broth, NB)和琼脂购自厦门兰博利德生物技术有限公司;细菌 DNA 提取试剂盒(DP302)购自天根生化科技(北京)有限公司;碘化丙啉(propidium iodine, PI)、核酸染料、DNA 上样缓冲液和 Annexin V-FITC (fluorescein isothiocyanate) 细胞凋亡检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。

超滤膜, Millipore 公司;超高效液相色谱仪, Waters 公司; H-7650 透射电子显微镜, Hitachi 公司;质谱仪、多功能酶标仪, ThermoFisher Scientific 公司;流式细胞仪, Beckman Coulter 有限公司; GelDoc XR 凝胶成像系统, Bio-Rad 公司。

1.2 人鼻液的质谱分析

收集 10 名健康志愿者[(20±4)岁]的新鲜鼻液样本。所有参与者都提供了书面知情同意书。首先,使用鼻腔冲洗器用无菌水冲洗志愿者鼻腔,将鼻液收集到无菌容器中。然后,将鼻液(1.5 mL)以 10 000 r/min 的转速离心 15 min,上清液经 3 kDa 超滤膜过滤后在 -20 °C 下保存。其次,使用超高效液相色谱-质谱(ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry, UPLC-MS)联用技术对鼻液中的多肽序列进行鉴定^[18]。结合搜库软件(MAXQUANT v1.6.5.0)

搜 UniProt Homo sapiens (Human) 蛋白库对所得肽段进行序列比对。

1.3 抗菌肽的筛选与合成

使用在线软件 APD3 (<https://aps.unmc.edu/>) 计算获得肽的电荷和疏水性, 然后, 在 SMARTBLAST 网站预测肽所在的蛋白质结构域 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/smartblast/smartBlast.cgi>)。多肽采用固相合成法合成, 使用具有 Agela C18 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)的反相高效液相色谱纯化^[19]。通过超高效液相色谱-质谱联用(high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)测定纯化后肽的纯度。冻干后储存在-20 °C下。

1.4 最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)的测定

按 Yuan 等^[20]报道的方法, 将金黄色葡萄球菌在 20 mL 营养肉汤培养基(NB)中 37 °C 培养 12 h, 以达到对数生长期。将细菌悬液在磷酸盐缓冲盐水(PBS, 0.01 mol/L, pH 7.2; 下同)中稀释至 10^5 – 10^6 CFU/mL, 再将肽稀释至不同浓度(1 000.0、500.0、250.0、125.0、62.5、31.3 和 15.7 μg/mL)。使用 96 孔板进行实验, 每孔分别取 50 μL 稀释后的菌液和不同浓度的肽等体积混合加入到 96 孔板。每孔再分别加入 100 μL 的新鲜营养肉汤培养基(NB), 37 °C 孵育 12 h。使用等体积的 PBS 和人源抗菌肽 LL-37 分别作为阴性对照和阳性对照, 重复实验 3 次, 取平均值。最低抑菌浓度(MIC)定义为在 37 °C 孵育 12 h 的 96 孔板中无可见细菌生长的最低浓度^[19]。

1.5 肽 A2M3 的时间杀伤分析

使用平板菌落计数法测定肽 A2M3 的时间杀伤曲线, 按参考文献[21]方法并加以改进。将金黄色葡萄球菌在 37 °C 培养 12 h 至对数生长期, 在无菌 PBS 中稀释至 10^5 – 10^6 CFU/mL。取 1×MIC 和 2×MIC 浓度的肽, 与菌液等体积混合

后于 37 °C 孵育 3 h。每隔 30 min 取样涂平板, 37 °C 倒置培养 24 h 后, 记录菌落总数。使用等体积的 PBS 作为空白对照。

1.6 肽 A2M3 对菌体超微结构的影响

透射电子显微镜能够观察肽 A2M3 对金黄色葡萄球菌细胞膜的影响。将 10^5 – 10^6 CFU/mL 的细菌在 37 °C 下, 用 2×MIC 的肽 A2M3 处理 3 h, 然后 2 700 r/min 离心 10 min, 并用 PBS 洗涤两次; 1%的钨酸固定后, 乙醇脱水; 丙酮处理 20 min; 样品在 70 °C 下烘烤 24 h, 超薄切片、染色。在 H-7650 透射电子显微镜下观察和捕获超微结构^[22]。

1.7 细菌 PI 摄取测定

取 50 μL 10^5 – 10^6 CFU/mL 的菌悬液加入到无菌的 1.5 mL 离心管中, 然后加入等体积不同浓度的肽溶液(1/2×MIC、1×MIC、2×MIC 和 4×MIC), 以等体积的 PBS 作为空白为对照。置于 37 °C 下培养 3 h 后加入 100 μL 碘化丙锭(propidium iodide, PI) (终浓度 10 μmol/L)避光孵育 15 min。使用多功能酶标仪测定样品在激发波长为 550 nm 和发射波长为 560–750 nm 范围内的荧光光谱, 检测 PI 荧光强度。

1.8 流式细胞术

按参考文献[23]方法, 流式细胞术用于测定细菌(金黄色葡萄球菌)细胞膜的通透性。将金黄色葡萄球菌在 37 °C 培养 12 h 至对数生长期, 取 1 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中 12 000 r/min 离心 1 min, 除去上清液, 重悬至 1 mL 无菌 PBS 中。将浓度为 1×MIC 和 2×MIC 的肽 A2M3 与菌液等比例混合(>200 μL), 然后放入 37 °C 生化培养箱, 分别处理 1、2、3 h, 以 PBS 作为空白对照组。接下来, 将处理过的细菌在室温下用 Annexin V-FITC 和碘化丙锭(PI)黑暗中染色 15 min, 采用流式细胞仪进行检测。

1.9 细菌蛋白质核酸泄露的测定

为了测定细菌胞内核酸和蛋白质的泄漏量,取-20 °C保存的金黄色葡萄球菌 200 μL 接种至 NB 中, 37 °C、160 r/min 摇床培养 12 h 至细菌的对数生长期, 取 1 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中 12 000 r/min 离心 1 min, 除去上清液, 重悬至 1 mL 无菌 PBS 中。使用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液稀释菌液与 1 \times MIC、2 \times MIC 浓度的肽等比例混合, 在 3 h 内, 每隔 1 h 在多功能酶标仪上分别测定 OD_{260} 和 OD_{280} 的吸光度。本实验以等量 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液与细菌等比例混合作为空白对照。

1.10 肽 A2M3 三维结构的预测

肽 A2M3 的结构使用在线软件 I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) 进行预测, 并利用 PyMol 2.5 软件进行编辑修改, 得到肽 A2M3 的三维结构。

1.11 DNA 凝胶阻滞实验

为了确定所鉴定的肽和细菌基因组 DNA 之间的潜在相互作用, 使用细菌 DNA 提取试剂盒提取金黄色葡萄球菌的基因组 DNA。金黄色葡萄球菌在 50 mL 营养肉汤培养基(NB)中 37 °C 培养 12 h, 用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取金黄色葡萄球菌基因组 DNA。通过测量 260 nm 和 280 nm 处的光密度比值($1.70 \leq OD_{260}/OD_{280} \leq 1.90$)来评估提取的基因组 DNA 的纯度。接下来, 将 10 μL DNA (110 ng/ μL)与连续量的肽 A2M3 在 37 °C 下混合孵育 90 min (肽:DNA=100:1、50:1、25:1、25:2、25:4、0), 再与 1 μL 的 10 \times DNA 上样缓冲液混合, 混合后吸取 8 μL 上样, 在 1%琼脂糖凝胶上进行电泳(电压 110 V)。使用 GelDoc XR 凝胶成像系统在紫外线照射下曝光 20 s, 观察 DNA 凝胶阻滞现象。

1.12 与 EB 竞争性结合 DNA 的荧光光谱实验

溴化乙锭(ethidium bromide, EB)竞争性结合 DNA 的荧光光谱实验能够分析肽 A2M3 与金

黄色葡萄球菌基因组 DNA 的作用方式, 根据 Zhang 等的方法进行适当的改进^[24]。用 TE 缓冲液将金黄色葡萄球菌的基因组 DNA (110 ng/ μL) 稀释为 50 ng/mL。向 96 孔板中加入 50 μL 的 DNA 溶液和 10 μL 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 EB 溶液, 37 °C 下避光孵育 10 min, 然后再加入 50 μL 的肽溶液 (1/2 \times MIC、1 \times MIC、2 \times MIC 和 4 \times MIC), 空白对照用 50 μL 的 PBS 代替, 混匀后放入 37 °C 生化培养箱中, 避光孵育 30 min。使用多功能酶标仪测定样品在激发波长 535 nm 及发射波长 610–770 nm 范围内的荧光光谱。

1.13 数据统计与分析

所有实验重复进行 3 次, 所得的 3 次独立实验数据均以平均值 \pm 标准差(standard deviation, SD)表示。数据使用 SPSS Statistics 26 软件对实验结果进行分析, 采用单因素分析法检验差异显著性比较, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 人鼻液中潜在抗菌序列的筛选与合成

在人类鼻液的质谱分析中, 发现了 1 700 个肽段, 其中 43 个肽段均来自 α -2-巨球蛋白(表 1), 并利用生物信息学技术对其结构域进行预测(图 1)。对鉴定出的 43 个肽段进行进一步筛选, 发现这些肽长度为 7–39 个氨基酸, 净电荷为-4–+2, 疏水性范围为 8.00%–67.00%。在 43 种 α -2-巨球蛋白衍生肽中, 一种 1 186.5 Da 的 11 个氨基酸的肽(SGFIPLKPTVK)被命名为 A2M3, 它的疏水性为 36.00%, 净电荷为+2, 表明它具有良好的抗菌潜力, 因此被选中做进一步性能表征。

肽 A2M3 采用固相合成法合成, 结果表明, 产物的色谱基线非常稳定, 主峰具有足够的对称性。肽 A2M3 的色谱纯化过程如图 2 所示。然后对 A2M3 的产物进行溶解, 质谱分析肽 A2M3 的纯度, 纯度达到 99.43%。

表 1 源自 α -2-巨球蛋白中潜在抗菌肽的理化参数

Table 1 Physicochemical properties of potential antimicrobial peptides of alpha-2-macroglobulin

Peptide sequences	Length (AA)	Net charge	Hydrophobic ratio (%)	Mw (Da)	Domain
AAQVTIQSSGTFSSK	15	+1	33.00	1 511.2	
AFALAGNQDK	10	0	50.00	1 034.1	
AVDQSVLLMKPDAELSASSVYNLLPEK	27	-2	44.00	2 918.4	A2M_N_2
AVLPTGDVIGDSAK	14	-1	43.00	1 342.5	A2M_N_2
DLTGFPGLNDQDNEDCINRHNVIYINGI	39	-4	23.00	4 352.7	
TYTPVSSTNEK					
DMYSFLEDMGLK	12	-2	42.00	1 448.7	
DTVIKPLLVEPEGLEK	16	-2	38.00	1 780.1	
FEVQVTPK	9	0	44.00	1 046.2	
FQVDNNNR	8	0	25.00	1 006.1	
GHFSISIPVK	10	1	40.00	1 084.3	A2M_N_2
GPTQEFK	7	0	14.00	805.9	
GTHGLLVK	8	1	38.00	824.0	A2M_N_2
GYLNTGYQR	9	+1	11.00	1 071.2	
HVEEPTETVR	11	-2	18.00	1 333.5	
HYDGSYSTFGER	12	-1	8.00	1 418.5	
IAQWQSFQLEGGLK	14	0	43.00	1 604.9	
KDNSVHWER	9	0	22.00	1 170.3	
KPQYMLVLPSSLHTETEK	19	0	32.00	2 214.6	
LHTEAQIQEEGTVVELTGR	19	-3	32.00	2 110.3	
LLLQVSLPELPGEYSMK	18	-1	39.00	2 045.4	
LPPNVVEESAR	11	-1	36.00	1 210.4	
LSFSPSQSLPASHAHLR	17	+1	35.00	1 835.1	A2M_N_2
PFFGQVR	7	+1	43.00	850.0	
PQLQYEMHGPEGLR	15	-1	20.00	1 783.0	
QFSFPLSSEPFQGSYK	16	0	25.00	1 849.0	
QQNAQGGFSSTQDTVVALHALSK	23	0	35.00	2 387.6	
QTVSWAVTPK	10	+1	40.00	1 116.3	
RTVMVK	7	+2	43.00	834.1	
SASNMAIVDK	11	0	55.00	1 134.3	A2M-recep
SLNEEAVK	8	-1	38.00	889.0	
SSSNEEVMFLTVQVK	15	-1	40.00	1 698.0	
TAQEGDHGSHVYTK	14	-1	14.00	1 529.6	
TEHPFTVEEFVLPK	14	-2	36.00	1 672.9	
TEVSSNHVLIYLDK	14	-1	36.00	1 617.9	A2M-recep
VGfyESDVMGR	11	-1	36.00	1 259.4	
VSVQLEASPAFLAVPVEK	18	-1	56.00	1 884.2	
VVSMDFHFHPLNELIPL	17	-3	47.00	1 967.3	
AFQPFVVEL	9	-1	67.00	1 097.3	A2M
DLKPAIVK	8	+1	50.00	883.1	A2M-recep
GVPIPNK	7	+1	29.00	723.9	
NQGNTWLTAF	10	0	40.00	1 151.2	
SGFIPLKPTVK	11	+2	36.00	1 186.5	A2M-recep
VLNYLPK	7	+1	43.00	846.0	A2M

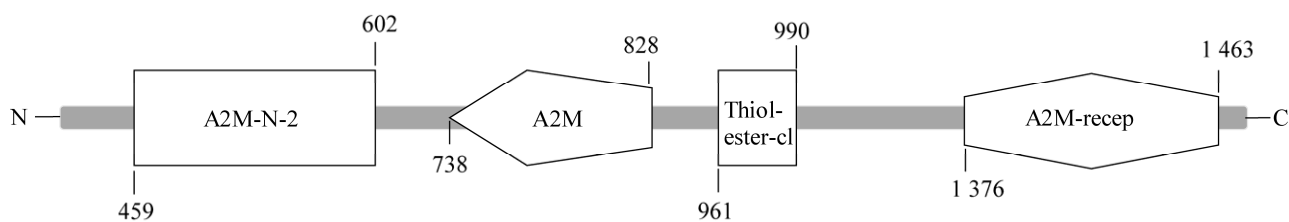


图 1 α -2-巨球蛋白的结构域

Figure 1 Structural domains of alpha-2-macroglobulin.

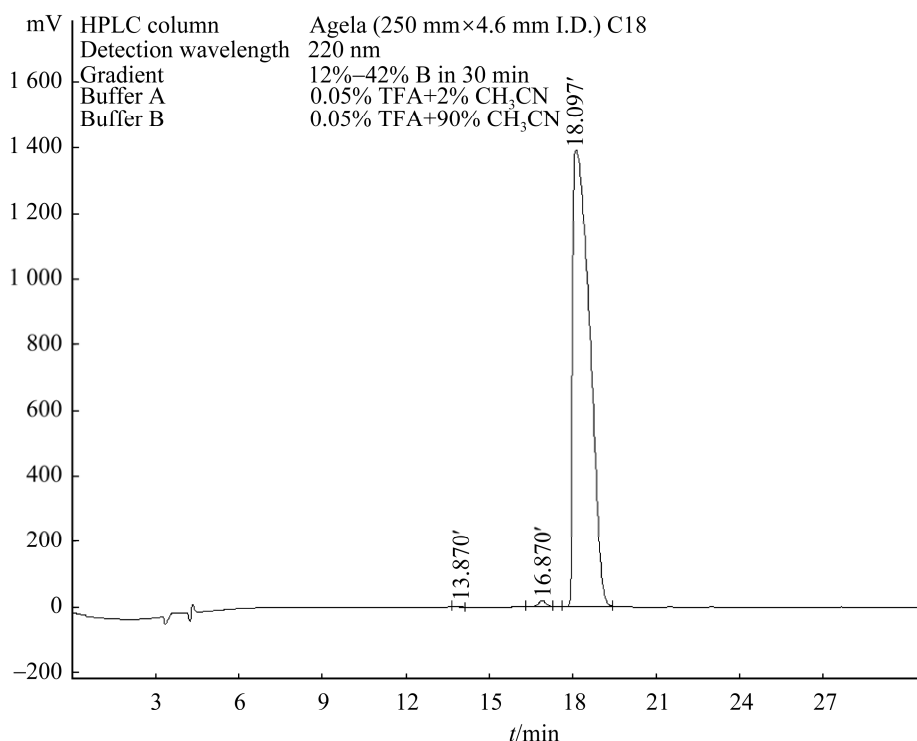


图 2 肽 A2M3 的合成纯化过程

Figure 2 Synthetic purification process of peptide A2M3.

2.2 肽 A2M3 对金黄色葡萄球菌的抗菌活性分析

为了研究肽 A2M3 对金黄色葡萄球菌的抗菌活性,使用化学合成的肽 A2M3 来测定其对金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度(MIC),为 125.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (表 2)。从时间杀伤曲线(图 3)更能

表 2 金黄色葡萄球菌 MIC 的测定结果

Table 2 Results of MIC determination for *Staphylococcus aureus*

Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	A2M3	LL-37
MIC	125.0	31.3

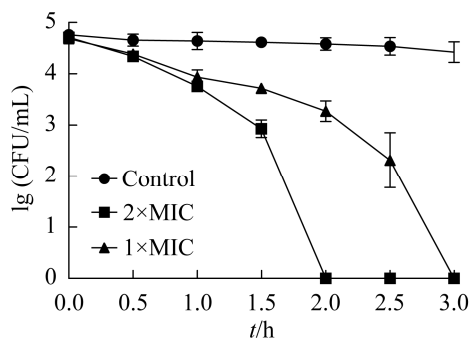


图 3 肽 A2M3 对金黄色葡萄球菌的时间杀伤曲线
Figure 3 Time-kill curve of peptide A2M3 against *Staphylococcus aureus*. Data represent the mean \pm s.e.m. of three biological replicates.

明显地看出,与空白对照组相比,加肽 A2M3 后的金黄色葡萄球菌的数量显著减少。肽 A2M3 对金黄色葡萄球菌在 1 h 开始有明显效果,当浓度为 1×MIC 时,金黄色葡萄球菌的数量减少了约 15.15%;随后继续呈下降趋势,在 3 h 后,将细菌全部杀灭。研究表明,肽 A2M3 对金黄色葡萄球菌的抑制效果随着作用时间的增加而显著增强。

2.3 肽 A2M3 对细菌细胞膜的影响

透射电镜(TEM)能够直观地观察肽 A2M3 处理后金黄色葡萄球菌细胞膜的变化情况。如

图 4 所示,使用 PBS 处理的细菌,菌体形态正常且饱满,细胞壁及细胞膜的结构完整清晰。2×MIC 的肽 A2M3 处理 3 h 后,细菌的细胞膜边缘模糊,细胞的形状变得不规则,部分细菌细胞膜破裂,内容物流出,表明抗菌肽 A2M3 对金黄色葡萄球菌的细胞膜具有破坏作用。

为了进一步确定肽 A2M3 对细菌(金黄色葡萄球菌)的影响,先用肽 A2M3 和对照组处理细菌,然后用碘化丙啶(PI)染色并测定其荧光强度。如图 5 所示,与对照组相比,肽 A2M3 处理后

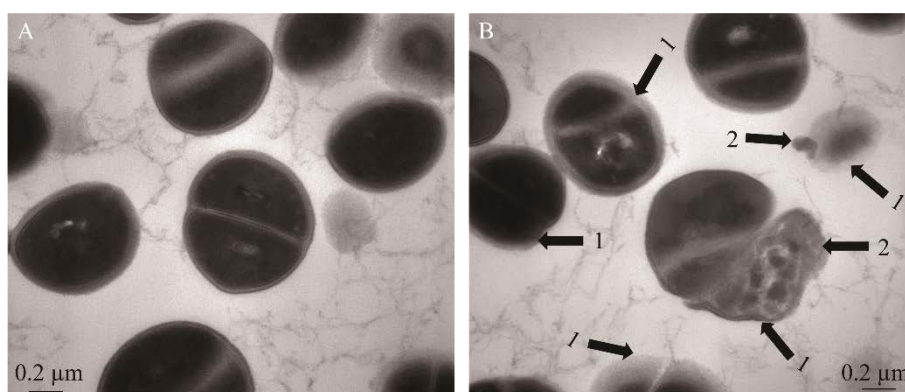


图 4 金黄色葡萄球菌的透射电镜图像

Figure 4 Transmission electron microscopy images of *Staphylococcus aureus*. A: Untreated *S. aureus* (no A2M3 present). B: *S. aureus* treated with A2M3. Arrow 1: Cell membrane with blurred edges and irregular shape; Arrow 2: Cell membranes ruptured and contents released.

的金黄色葡萄球菌的 PI 荧光信号明显增加,且在较低的浓度下依然会引起明显的荧光增强。使用 Annexin V-FITC 和 PI 双染,通过流式细胞术进一步表征肽 A2M3 对金黄色葡萄球菌的作用。不同浓度的肽 A2M3 (1×MIC 和 2×MIC)使细菌细胞的活细胞比例逐渐下降,而死细胞的百分比呈浓度依赖性逐渐增加(图 6)。培养 1 h 后,对照组的活细胞率为 99.08%,而 1×MIC 和 2×MIC 的活细胞率分别为 86.14%和 82.88%,孵育 3 h 后,1×MIC 和 2×MIC 的活细胞率分别降至 20.76%和 6.26%。研究结果进一步证实,肽 A2M3 对金黄色葡萄球菌的细胞膜通透性产生影响,导致细菌死亡。

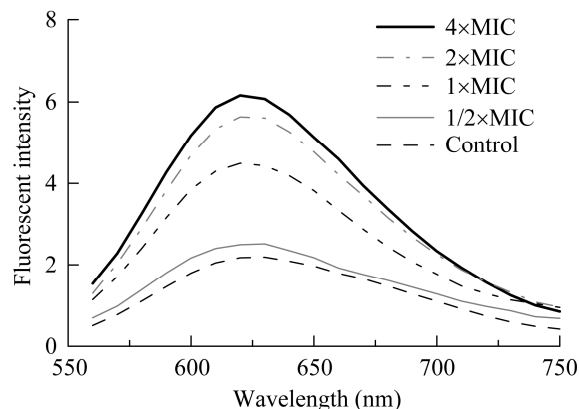


图 5 肽 A2M3 处理后金黄色葡萄球菌细胞内透膜通透性的变化

Figure 5 Changes of intracellular membrane permeability of *Staphylococcus aureus* treated with peptide A2M3.

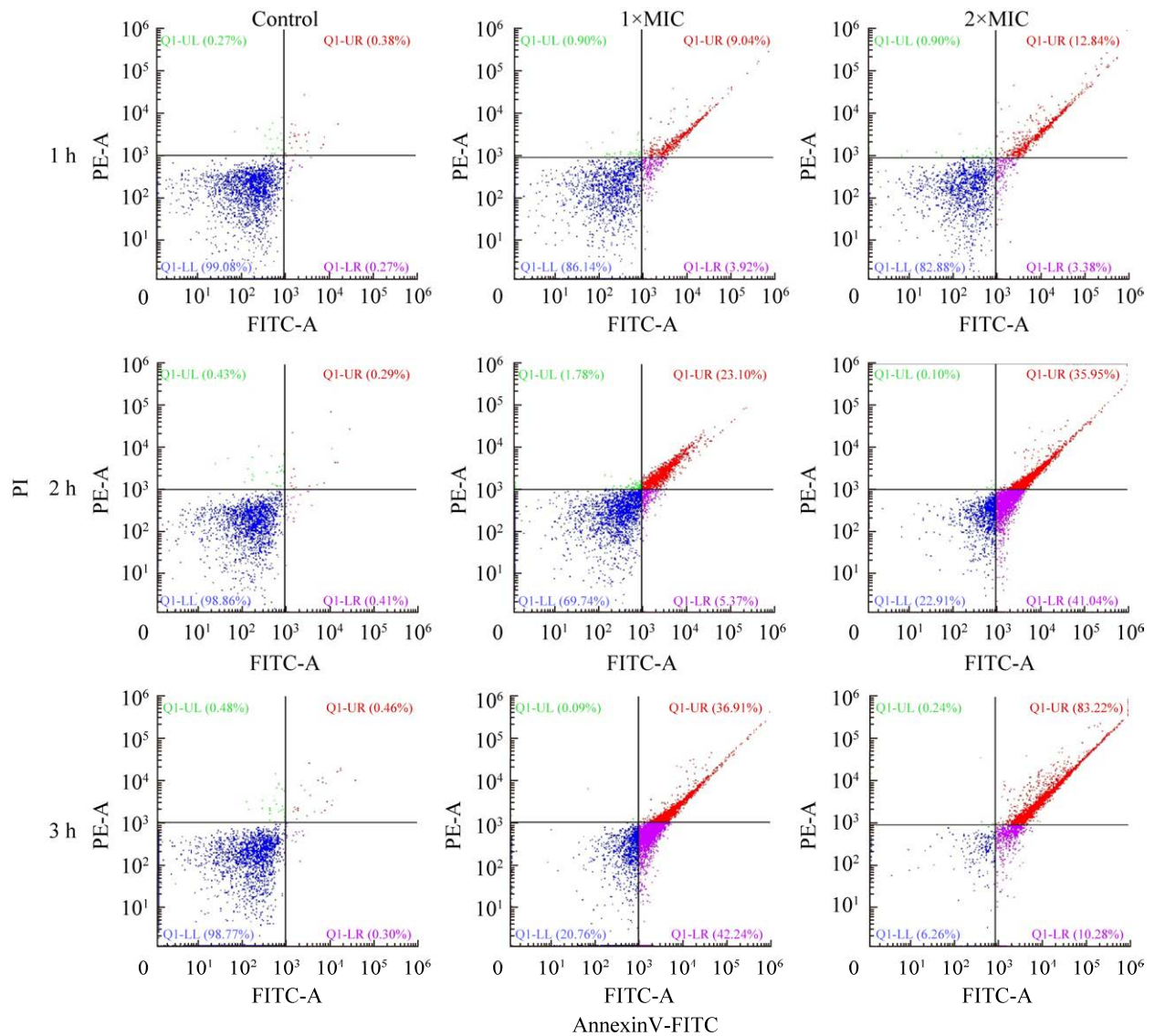


图 6 通过流式细胞仪评估肽 A2M3 对金黄色葡萄球菌细胞膜的渗透性

Figure 6 Permeability of peptide A2M3 to *Staphylococcus aureus* cell membranes assessed by flow cytometry.

通过测定菌悬液离心后的上清在 260 nm 和 280 nm 处吸光度的变化, 进一步探究细菌细胞膜的通透性。如图 7 所示, 未加肽 A2M3 的空白组上清液中核酸和蛋白质含量处于一个较低且无明显变化的范围; 随着作用时间的延长, 实验组的核酸及蛋白质泄露的含量对肽 A2M3 表现出一定的浓度依赖性。这表明肽 A2M3 通过

增加金黄色葡萄球菌细胞膜的通透性, 引起胞内的核酸和蛋白质泄露。

因此, 根据以上实验结果结合生物信息学预测阳离子肽 A2M3 的二级结构(图 8)可以得出, 肽 A2M3 对金黄色葡萄球菌细胞膜的通透性产生影响, 造成细胞膜破裂, 胞内的核酸和蛋白质泄露。

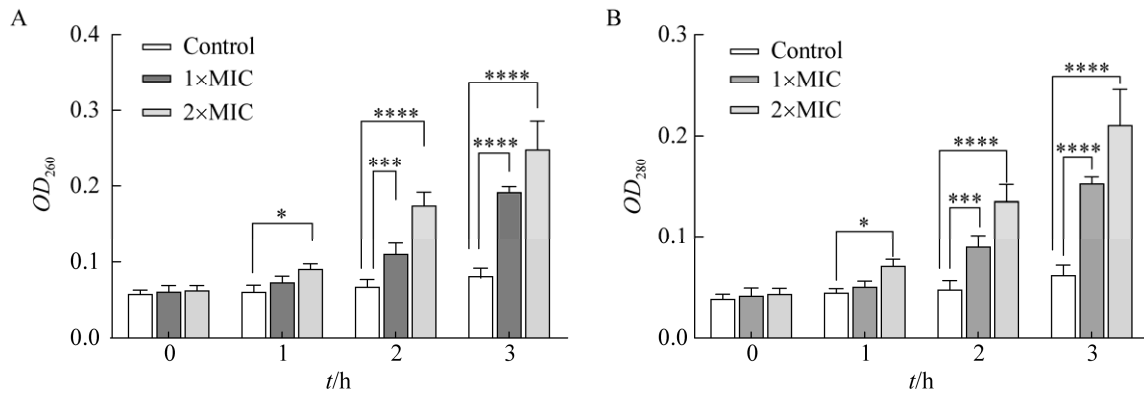


图 7 肽 A2M3 处理后细菌细胞中核酸和蛋白质的泄漏

Figure 7 Leakage of nucleic acid and protein in bacterial cells after peptide A2M3 treatment. A: Leakage of intracellular nucleic acids at 260 nm. B: Leakage of intracellular proteins at 280 nm. Data shown represent one of three independent experiments and the values represent mean±SD (n=3); *: P<0.05; ***: P<0.001; ****: P<0.0001.

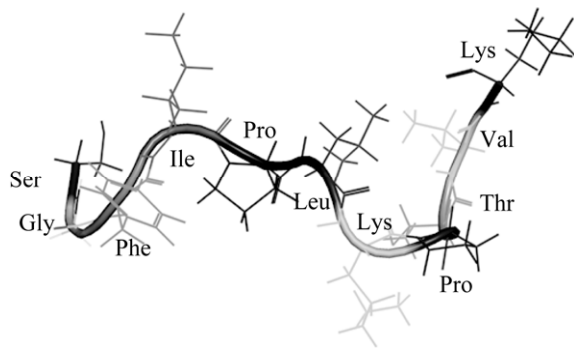


图 8 肽 A2M3 的三维结构预测

Figure 8 3D structure prediction of peptide A2M3.

2.4 肽 A2M3 对金黄色葡萄球菌基因组 DNA 的影响

通过 DNA 凝胶阻滞实验研究肽 A2M3 对金黄色葡萄球菌 DNA 的作用。如图 9 所示，不同质量比的肽 A2M3 (100:1、50:1、25:1、25:2、25:4、0) 作用于金黄色葡萄球菌的 DNA 后，菌体 DNA 条带的亮度发生明显变化。当肽 A2M3 的质量比增加到 100:1 时，DNA 条带的亮度完全消失；肽 A2M3 与 DNA 的比为 25:1 时，DNA 条带的亮度依然比对照组的亮度低。随着肽 A2M3 质量的减少，DNA 条带明显变亮也越清晰。

为了进一步探究肽 A2M3 与金黄色葡萄球

菌基因组 DNA 的相互作用，分析了肽 A2M3 与 EB 竞争性结合 DNA 的荧光光谱。当 EB 被肽 A2M3 取代，以相同的方式嵌插入 DNA，其荧光强度下降。如图 10 所示，加入肽 A2M3 的试

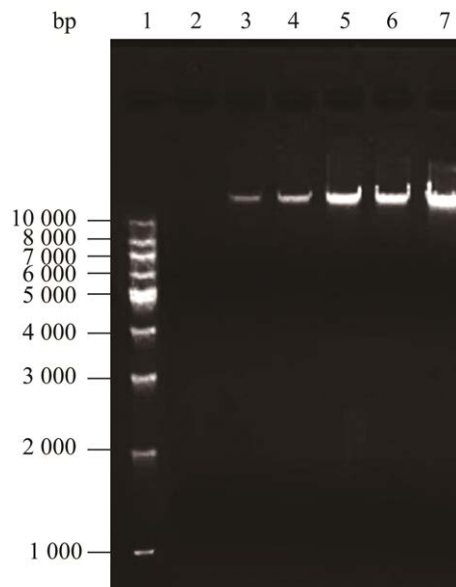


图 9 凝胶阻滞分析肽 A2M3 对金黄色葡萄球菌 DNA 的相互作用

Figure 9 Gel retardation analysis of the interaction between peptide A2M3 and DNA of *Staphylococcus aureus*. Lane 1: DNA marker; Lane 2–7: Peptide A2M3 mass ratios of 100:1, 50:1, 25:1, 25:2, 25:4, 0.

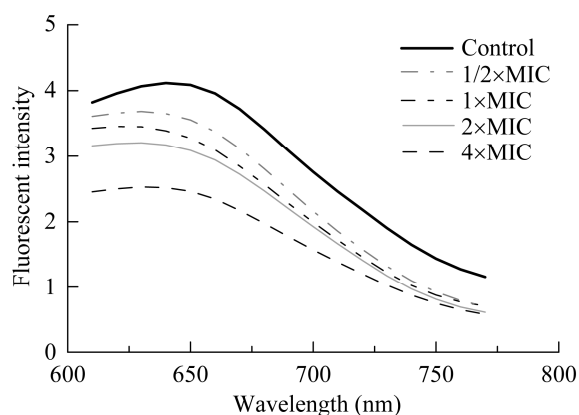


图 10 肽 A2M3 与 EB 竞争性结合金黄色葡萄球菌 DNA 的荧光光谱

Figure 10 Fluorescence spectra of peptide A2M3 competing with EB for binding to DNA of *Staphylococcus aureus*.

验组, 其荧光强度随着 A2M3 浓度的升高而降低, 且 A2M3 的浓度越高, 其下降趋势越明显。说明肽 A2M3 对金黄色葡萄球菌 DNA 的作用方式也是嵌插入 DNA 的碱基对中, 从而影响其正常的生理功能, 最终导致菌体死亡。

3 讨论与结论

尽管抗菌肽在来源(天然/合成)、作用机制、结构和理化特性以及治疗领域方面有所不同, 但在抗菌肽的开发上仍然有许多共性^[25]。一般来说, 净电荷范围在+2~+9(即阳离子)的多肽具有良好的抑菌活性, 这是因为阳离子抗菌肽能够与细菌细胞膜上带负电荷的脂多糖静电结合^[26]。肽的疏水性氨基酸残基对其抑菌活性也起着关键作用, 通常疏水氨基酸的百分比 $\geq 30.00\%$ ^[27]。虽然高的疏水性抗菌肽能够增加与微生物膜的结合亲和力, 但疏水性过高会导致肽二聚化, 从而削弱其抗菌活性^[28]。因此, 结合生物信息学分析发现序列 A2M3 (SGFIPLKPTVK)具有典型的抗菌肽特征。

α -2-巨球蛋白(A2M)家族蛋白是一种重要的

多功能蛋白, 通常由多个结构域组成, 在后生物(包括古细菌和细菌)中高度保守^[29]。对质谱分析中鉴定出的 43 种 α -2-巨球蛋白衍生肽的分析表明, 来自于 A2M-N-2 和 A2M 结构域的肽段分别有 5 个和 2 个, 该结构域位于 α -巨球蛋白家族的 N 末端和 C 末端, 没有形成具体的构象。而有 4 个肽段(包括 A2M3)来自 A2M-recep, 是 α -2-巨球蛋白家族的受体结构域(receptor domains, RBD), 由多个 β -片层组成的 β 夹心结构域^[30]。RBD 与受体——低密度脂蛋白受体相关蛋白(low density lipoprotein receptor-related protein, LRP)紧密结合后起信号传导作用, 触发结构转变以捕获蛋白酶, 发挥蛋白酶抑制剂的功能^[31]。肽的两亲性(α -螺旋, β -折叠片)构型在形成细胞膜的孔洞中起着至关重要的作用, 因为疏水性残基与磷脂膜相互作用, 而亲水性残基则形成通道的内腔从而对细菌细胞膜造成损害^[32]。

众所周知, 20%~30%的人是金黄色葡萄球菌的鼻携带者, 这些金黄色葡萄球菌在携带留置装置或免疫功能低下的患者中引起感染^[13,33]。抗菌肽作为免疫系统的关键组成之一, 可以有效地抑制病原微生物感染的发病机制, 保护宿主免受伤害^[34]。人源抗菌肽 LL-37 对细菌、真菌、病毒甚至寄生虫都表现出广谱的抗微生物活性, 在生物和医药领域应用广泛^[35]。在本研究中, 人源抗菌肽 LL-37 对金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度(MIC)为 31.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。从源自人鼻液的 α -2-巨球蛋白中筛选出的抗菌肽 A2M3 对金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度是 125.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。尽管人源抗菌肽 LL-37 的 MIC 低于肽 A2M3, 但对于合成肽来说, 长的肽序列会增加合成的成本, 为了解决这个缺点, 一些研究人员会选择较短序列的肽段替代它们, 如来源于 LL-37 的抗菌肽 KR-12-3 (KRIVKWIKKFLR)对戈氏链球菌具有抗菌活性, 其 MIC 为 156.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 具有口腔

护理产品活性成分的潜力^[36]。抗菌肽的长短还影响其细胞毒性,开发新型抗菌肽的低毒性也是要考虑的问题^[32]。因此,肽 A2M3 不仅可以有效地杀灭金黄色葡萄球菌,还可以降低合成肽的成本,无耐药性。

探究肽 A2M3 对金黄色葡萄球菌的抑菌机制,透射电镜的结果显示,肽 A2M3 对金黄色葡萄球菌的细胞膜能够造成损伤。本研究中 PI 的荧光强度随着肽 A2M3 浓度的增加不断增强,证实了肽 A2M3 对金黄色葡萄球菌的细胞膜通透性产生影响。流式细胞术和蛋白质核酸泄露实验进一步表明,随着作用时间和浓度的增加,金黄色葡萄球菌的细胞膜通透性产生变化,胞膜破裂,致使金黄色葡萄球菌死亡。正常情况下,细胞膜在调控细胞渗透压及信号介导等方面起重要作用,但在遭到破坏时会导致胞内的物质外泄,胞外的物质借此进入细胞,影响细胞的正常生理功能造成细胞死亡^[37]。此外, Nie 等通过生物信息学设计和原核表达 4 种新的抗菌肽-溶素嵌合体,其中 P362 和 P372 通过增加沙门氏菌外膜的渗透性和特异性溶解细胞壁,释放出核酸和蛋白质,导致细菌死亡^[38]。

结合生物信息学预测阳离子肽 A2M3 的二级结构并分析其作用机制,肽 A2M3 的组成氨基酸中有 2 个脯氨酸(P),有利于肽形成无规则结构。虽然常见的抗菌肽二级结构为 α 螺旋,但越来越多无规则卷曲的抗菌肽被鉴定。例如,来自凡纳滨对虾的抗菌肽 PV13 是一种富含脯氨酸的阳离子抗菌肽,能够增加细菌细胞膜内膜通透性,并穿过副溶血性弧菌的细胞膜在胞内与 DNA 相结合,从而达到杀菌效果^[39]。此外,肽 A2M3 中带正电的赖氨酸(K)残基可能对其抑菌性有所贡献。赖氨酸与带负电的磷脂头基之间的静电相互作用,有助于无规则结构的肽 A2M3 与细菌细胞膜的脂质层表面进行初始结合,而疏

水氨基酸残基(即苯丙氨酸 F、亮氨酸 L、异亮氨酸 I、缬氨酸 V 和脯氨酸 P)增强肽 A2M3 与细菌膜之间的作用,以促进肽 A2M3 进入细菌的磷脂双层,使膜去极化和破坏,并导致细菌死亡^[40]。

研究表明,抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)可以直接破坏细菌细胞膜,影响细菌细胞膜通透性造成胞内物质泄漏,从而引发细菌死亡^[41]。或抗菌肽能够在细胞膜上形成孔洞,穿过细胞膜后作用于细胞内靶标,如 DNA 和蛋白质,抑制其功能从而导致细菌死亡^[42]。与只有一个靶标的传统抗生素不同,AMPs 可以在多个靶标上消灭病原体,大大减少耐药细菌的出现^[43]。通过 DNA 凝胶阻滞实验和与 EB 的竞争实验探究肽 A2M3 对金黄色葡萄球菌 DNA 的作用。在凝胶电泳中,随着肽 A2M3 浓度的增加,电泳条带的亮度逐渐降低。说明肽 A2M3 能够阻滞细菌 DNA 的迁移,这可能是因为肽 A2M3 与金黄色葡萄球菌的 DNA 结合,从而竞争了核酸染料与 DNA 的结合位点,阻滞其在凝胶电泳中迁移并使 DNA 的条带变暗。肽 A2M3 与 EB 的竞争实验结果进一步表明肽 A2M3 能够以较高亲和力将 EB 取代,以相同的方式插入到 DNA 的碱基对中,使整个体系的荧光强度下降。同样,杨昆等^[44]也得出相似的结论,抗菌肽 NZ2114 能够与 EB 竞争结合其位点,并嵌入停乳链球菌的 DNA 碱基对。由此可知,肽 A2M3 也是以嵌插的方式与 EB 竞争性地结合 DNA,进而影响 DNA 的正常功能,使菌体的生长繁殖受到抑制达到抑菌的目的。

在本研究中,从源自人鼻液的 α -2-巨球蛋白中筛选出的抗菌肽 A2M3 对金黄色葡萄球菌的抑菌机制涉及多靶点协同。金黄色葡萄球菌的细胞膜是抗菌肽 A2M3 主要的靶点之一,随着作用时间和浓度的增加,肽 A2M3 对金黄色葡萄球菌的细胞膜通透性产生影响,细胞膜破裂;此

外, 抗菌肽 A2M3 还可以穿透细胞膜嵌入 DNA 的碱基对, 影响细菌的基因功能, 从而导致菌体死亡。因此, 从人鼻液中筛选具有抗菌活性的肽 A2M3 并对其作用机制进行研究, 为医学和微生物病原体带来挑战的其他领域的应用提供了理论基础。

参考文献

- [1] YANG S, DONG YT, AWEYA JJ, LI J, CHEN XY, ZHANG YL, LIU GM. A hemoglobin-derived antimicrobial peptide, LCH₄, from the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) with potential use as a food preservative[J]. *LWT*, 2020, 131: 109656.
- [2] 谭超, 周靖轩, 卢倩倩, 刘彬彬, 蔡轶, 王君, 邹黎黎. 紫草素与依布诺啉对金黄色葡萄球菌的协同作用[J]. *微生物学报*, 2022, 62(3): 1049-1060.
TAN C, ZHOU JX, LU QQ, LIU BB, CAI Y, WANG J, ZOU LL. The synergistic effect of shikonin and ebselen against *Staphylococcus aureus*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(3): 1049-1060 (in Chinese).
- [3] 杨思宇, 范钊玮, 李皖豫, 崔玉东. 金黄色葡萄球菌的免疫逃逸策略[J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(15): 1908-1913.
YANG SY, FAN ZW, LI WY, CUI YD. Immune evasion of *Staphylococcus aureus*[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2021, 37(15):1908-1913 (in Chinese).
- [4] POLLITT EJG, SZKUTA PT, BURNS N, FOSTER SJ. *Staphylococcus aureus* infection dynamics[J]. *PLoS Pathogens*, 2018, 14(6): e1007112.
- [5] CHENG AG, DeDENT AC, SCHNEEWIND O, MISSIAKAS D. A play in four acts: *Staphylococcus aureus* abscess formation[J]. *Trends in Microbiology*, 2011, 19(5): 225-232.
- [6] GIERSING BK, DASTGHEYB SS, MODJARRAD K, MOORTHY V. Status of vaccine research and development of vaccines for *Staphylococcus aureus*[J]. *Vaccine*, 2016, 34(26): 2962-2966.
- [7] HOSSEINKHANI F, JABALAMELI F, NODEH FARAHANI N, TAHERIKALANI M, van LEEUWEN WB, EMANEINI M. Variable number of tandem repeat profiles and antimicrobial resistance patterns of *Staphylococcus haemolyticus* strains isolated from blood cultures in children[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2016, 38: 19-21.
- [8] PUAH SM, TAN JAMA, CHEW CH, CHUA KH. Diverse profiles of biofilm and adhesion genes in *Staphylococcus aureus* food strains isolated from sushi and sashimi[J]. *Journal of Food Science*, 2018, 83(9): 2337-2342.
- [9] MA Z, WEI DD, YAN P, ZHU X, SHAN AS, BI ZP. Characterization of cell selectivity, physiological stability and endotoxin neutralization capabilities of α -helix-based peptide amphiphiles[J]. *Biomaterials*, 2015, 52: 517-530.
- [10] BUCK AK, ELMORE DE, DARLING LE. Using fluorescence microscopy to shed light on the mechanisms of antimicrobial peptides[J]. *Future Medicinal Chemistry*, 2019, 11(18): 2447-2460.
- [11] 汪庆, 张瑞芬, 王亚楠, 朱宝利, 曾斌. 抗菌肽结构改造与人工智能研发策略[J]. *微生物学报*, 2022, 62(11): 4353-4366.
WANG Q, ZHANG RF, WANG YN, ZHU BL, ZENG B. Antimicrobial peptides: structure modification and development with artificial intelligence[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(11): 4353-4366 (in Chinese).
- [12] FJELL CD, HISS JA, HANCOCK REW, SCHNEIDER G. Designing antimicrobial peptides: form follows function[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2012, 11(1): 37-51.
- [13] RUPPÉ E, BARBIER F, MESLI Y, MAIGA A, COJOCARU R, BENKHALFAT M, BENCHOUK S, HASSAINE H, MAIGA I, DIALLO A, KOUMARÉ AK, OUATTARA K, SOUMARÉ S, DUFOURCQ JB, NARETH C, SARTHOU JL, ANDREMONT A, RUIMY R. Diversity of staphylococcal cassette chromosome *mec* structures in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* strains among outpatients from four countries[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53(2): 442-449.
- [14] DO TQ, MOSHKANI S, CASTILLO P, ANUNTA S, POGOSYAN A, CHEUNG A, MARBOIS B, FAULL KF, ERNST W, CHIANG SM, FUJII G, CLARKE CF, FOSTER K, PORTER E. Lipids including cholesteryl linoleate and cholesteryl arachidonate contribute to the inherent antibacterial activity of human nasal fluid[J]. *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)*, 2008, 181(6): 4177-4187.
- [15] COLE AM, DEWAN P, GANZ T. Innate antimicrobial activity of nasal secretions[J]. *Infection and Immunity*, 1999, 67(7): 3267-3275.

- [16] COLE AM, LIAO HI, STUCHLIK O, TILAN J, POHL J, GANZ T. Cationic polypeptides are required for antibacterial activity of human airway fluid[J]. *The Journal of Immunology*, 2002, 169(12): 6985-6991.
- [17] QUINN GA, COLE AM. Suppression of innate immunity by a nasal carriage strain of *Staphylococcus aureus* increases its colonization on nasal epithelium[J]. *Immunology*, 2007, 122(1): 80-89.
- [18] DAI JY, JIN RT, GAO JL, AWEYA JJ, LIN R, LI GL, YANG S. Antibacterial activity and mechanism of peptide PV-Q5 against *Vibrio parahaemolyticus* and *Escherichia coli*, derived from salt-fermented *Penaeus vannamei*[J]. *Foods (Basel, Switzerland)*, 2023, 12(9): 1804.
- [19] YANG S, HUANG H, AWEYA JJ, ZHENG ZH, LIU GM, ZHANG YL. PvHS9 is a novel *in silico* predicted antimicrobial peptide derived from hemocyanin of *Penaeus vannamei*[J]. *Aquaculture*, 2021, 530: 735926.
- [20] YUAN ZJ, AWEYA JJ, LI J, WANG Z, HUANG S, ZHENG M, YANG S. Synergistic antibacterial effects of low-intensity ultrasound and peptide LCMHC against *Staphylococcus aureus*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2022, 373: 109713.
- [21] YANG S, DONG YT, AWEYA JJ, XIE TY, ZENG BB, ZHANG YL, LIU GM. Antimicrobial activity and acting mechanism of *Tegillarca granosa* hemoglobin-derived peptide (TGH1) against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 147: 104302.
- [22] GANG H, YONG SH, YA TL, GUO WL. The membrane action mechanism of analogs of the antimicrobial peptide Buforin 2[J]. *Peptides*, 2009, 30(8): 1421-1427.
- [23] ZHANG LL, ZHANG LF, XU JG. Chemical composition, antibacterial activity and action mechanism of different extracts from hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge.)[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 8876.
- [24] ZHANG HY, LIU S, LI XD, WANG WJ, DENG LL, ZENG KF. Interaction of antimicrobial peptide ponicin W1, thanatin, and mastatopara-S with *Geotrichum citri-aurantii* genomic DNA[J]. *Foods*, 2021, 10(8): 1919.
- [25] MAHLAPUU M, BJÖRN C, EKBLÖM J. Antimicrobial peptides as therapeutic agents: opportunities and challenges[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2020, 40(7): 978-992.
- [26] CIUMAC D, CAMPBELL RA, XU H, CLIFTON LA, HUGHES AV, WEBSTER JRP, LU JR. Implications of lipid monolayer charge characteristics on their selective interactions with a short antimicrobial peptide[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017, 150: 308-316.
- [27] CHEN YX, GUARNIERI MT, VASIL AI, VASIL ML, MANT CT, HODGES RS. Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of α -helical antimicrobial peptides[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007, 51(4): 1398-1406.
- [28] TACHI T, EPAND RF, EPAND RM, MATSUZAKI K. Position-dependent hydrophobicity of the antimicrobial Magainin peptide affects the mode of peptide-lipid interactions and selective toxicity[J]. *Biochemistry*, 2002, 41(34): 10723-10731.
- [29] STURROCK ED, LUBBE L, COZIER GE, SCHWAGER SLU, AROWOLO AT, ARENDSE LB, BELCHER E, ACHARYA KR. Structural basis for the C-domain-selective angiotensin-converting enzyme inhibition by bradykinin-potentiating peptide b (BPPb)[J]. *The Biochemical Journal*, 2019, 476(10): 1553-1570.
- [30] VANDOOREN J, ITOH Y. Alpha-2-macroglobulin in inflammation, immunity and infections[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 803244.
- [31] ARIMURA Y, FUNABIKI H. Structural mechanics of the alpha-2-macroglobulin transformation[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2022, 434(5): 167413.
- [32] THAKUR A, SHARMA A, ALAJANGI HK, JAISWAL PK, LIM YB, SINGH G, BARNWAL RP. In pursuit of next-generation therapeutics: antimicrobial peptides against superbugs, their sources, mechanism of action, nanotechnology-based delivery, and clinical applications[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 218: 135-156.
- [33] STENSEN DB, SMÅBREKKE L, OLSEN K, GRIMNES G, NIELSEN CS, ERICSON JU, SIMONSEN GS, ALMÅS B, FURBERG AS. Circulating sex-steroids and *Staphylococcus aureus* nasal carriage in a general male population[J]. *Epidemiology and Infection*, 2022, 150: e93.
- [34] FEI F, WANG T, JIANG YY, CHEN XL, MA CB, ZHOU M, WU QN, CAO P, DUAN JN, CHEN TB, BURROWS JF, WANG L. A frog-derived antimicrobial peptide as a potential anti-biofilm agent in combating *Staphylococcus aureus* skin infection[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2023, 27(11): 1565-1579.

- [35] BABIKIR IH, ABUGROUN EA, BILAL NE, ALGHASHAM AA, ABDALLA EE, ADAM I. The impact of cathelicidin, the human antimicrobial peptide LL-37 in urinary tract infections[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2018, 18(1): 17.
- [36] ZHUO HW, ZHANG X, LI MG, ZHANG Q, WANG YL. Antibacterial and anti-inflammatory properties of a novel antimicrobial peptide derived from LL-37[J]. *Antibiotics*, 2022, 11(6): 754.
- [37] 张炜, 宁春妹, 杭柏林, 钱琨, 秦爱建, 胡建和. 抗菌肽 BSN-37 对大肠杆菌胞内物质泄露的影响[J]. *现代畜牧兽医*, 2019(5): 20-25.
ZHANG W, NING CM, HANG BL, QIAN K, QIN AJ, HU JH. Effects of antimicrobial peptide BSN-37 on intracellular material leakage of *Escherichia coli*[J]. *Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2019(5): 20-25 (in Chinese).
- [38] NIE T, MENG FQ, ZHOU LB, LU FX, BIE XM, LU ZX, LU YJ. *In silico* development of novel chimeric lysins with highly specific inhibition against *Salmonella* by computer-aided design[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(12): 3751-3760.
- [39] 王铭遥, 郑明静, 任中阳, 石林凡, 邓尚贵, 杨桑. 凡纳滨对虾抗菌肽的筛选及与 DNA 的结合机制[J]. *中国食品学报*, 2023, 23(7): 140-151.
WANG MY, ZHENG MJ, REN ZY, SHI LF, DENG SG, YANG S. Antimicrobial peptides screened from *Penaeus vannamei* shrimp and investigation of their DNA binding mechanism[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2023, 23(7): 140-151 (in Chinese).
- [40] YANG S, XING YF, GAO JL, JIN RT, LIN R, WENG WY, XIE YH, AWEYA JJ. *Lactocaseibacillus paracasei* fermentation broth identified peptide, Y₂Fr, and its antibacterial activity on *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2023, 182: 106260.
- [41] 陈飞龙, 刘渔珠, 彭勃, 陈咏春, 苗建银, 曹庸. 抗菌肽 F1 对金黄色葡萄球菌的胞内作用机制[J]. *食品科学*, 2017, 38(6): 36-41.
CHEN FL, LIU YZ, PENG B, CHEN YC, MIAO JY, CAO Y. Intracellular mechanism of action of antimicrobial peptide F1 on *Staphylococcus aureus*[J]. *Food Science*, 2017, 38(6): 36-41 (in Chinese).
- [42] SUN A, HUANG Z, HE L, DONG W, TIAN Y, HUANG A, WANG X. Metabolomic analyses reveal the antibacterial properties of a novel antimicrobial peptide MOP3 from *Moringa oleifera* seeds against *Staphylococcus aureus* and its application in the infecting pasteurized milk[J]. *Food Control*, 2023, 150: 109779.
- [43] XUAN JQ, FENG WG, WANG JY, WANG RC, ZHANG BW, BO LT, CHEN ZS, YANG H, SUN LM. Antimicrobial peptides for combating drug-resistant bacterial infections[J]. *Drug Resistance Updates*, 2023, 68: 100954.
- [44] 杨昆, 王欢, 高洁, 李钰芳, 赵琼, 施娅楠, 黄艾祥. 抗菌肽 BCp12 对大肠杆菌壁膜及 DNA 损伤的作用机制[J]. *食品科学*, 2021, 42(19): 114-121.
YANG K, WANG H, GAO J, LI YF, ZHAO Q, SHI YN, HUANG AX. Mechanism by which antimicrobial peptide BCp12 acts on the cell wall and membrane of *Escherichia coli* cells and induces DNA damage[J]. *Food Science*, 2021, 42(19): 114-121 (in Chinese).