

抗菌肽的研究现状和挑战*

唐馨^{1,2} 毛新芳³ 马彬云² 苟萍^{1**}

(1 新疆大学生命科学与技术学院 乌鲁木齐 830046 2 南加州大学 Keck 医学院 洛杉矶 90033)

(3 四川轻化工大学化学工程学院 自贡 643000)

摘要 抗菌肽(AMPs)广泛存在于生物体内,可以协助机体抵御外源微生物的侵害,是生物体先天性防御系统中的重要组成成分。普遍认为,抗菌肽通过膜损伤机制,破坏微生物细胞膜或细胞壁的完整性,达到抑杀微生物的目的。然而,越来越多的证据表明抗菌肽还存在非膜损伤机制,作用于胞内靶位点杀伤细胞。由于其独特的作用机制及广谱抗菌活性,抗菌肽被应用于各行各业。但是,抗菌肽的推广应用也面临着诸多难题,如生物稳定性、抗菌活性的维持和微生物耐受性等。主要对抗菌肽的种类、作用机制、微生物对抗菌肽耐受性的产生机制及抗菌肽的应用和挑战进行综述。

关键词 抗菌肽 非膜损伤型 抗菌机制 耐受性

中图分类号 Q51

1980年,Steiner等^[1]首次在天蚕体内发现阳离子抗菌肽(cecropins A和cecropins B)的存在,它们被认为是昆虫抵御病原菌侵染的首要防御系统组分。1987年,Zaslloff^[2]从非洲爪蟾皮肤中分离获得抗菌肽(magainins)。随后,研究者发现抗菌肽分布广泛,存在于哺乳动物、蛛形纲、两栖动物、植物、真菌,甚至是单细胞微生物中^[3-4]。研究表明抗菌肽是宿主先天性防御系统中的重要组成成分,具有抗细菌^[5]、抗病毒^[6]、抗真菌^[7]、抗寄生虫^[8]等活性。此外,在抑制肿瘤^[9]、抗生物膜^[10]及免疫调控^[11]过程中,抗菌肽也发挥着重要作用。

从抗菌肽被发现至今,越来越多的抗菌肽从所认知的物种中被分离鉴定出来。目前,可以从几个数据库查阅抗菌肽信息:1、由University of Nebraska维护的APD3数据库,收录了>2,500种抗菌肽^[12];2、DRAMP数据库记录了17349条抗菌肽序列,其中包括4571条常见序列,12704条已经申请专利的抗菌肽序列及74个正在进行药物研发的抗菌肽^[13];3、BaAMPs收录了大约200种具有抗生物膜活性的抗菌肽^[14]。由于抗菌

肽具有广谱抗菌活性,被认为是一种有效的传统抗生素替代品。关于抗菌肽的研究从未停止,新型的抗菌肽及其序列被不断地发现并报道。本文主要针对抗菌肽的作用机制,尤其是近年来发现的抗菌肽非膜损伤型作用机制,微生物对抗菌肽耐受性的产生机制及抗菌肽在推广应用中面临的挑战,进行相关综述。

1 抗菌肽的分类

1.1 根据抗菌肽的长度分类

抗菌肽通常只含有9~100个氨基酸,Wang^[12]对APD3数据库收录的2722条抗菌肽进行分析发现,大约90%抗菌肽的长度少于50个氨基酸。其中,具有功能的多肽长度集中于21~30个氨基酸^[12]。

1.2 根据疏水含量分类

即抗菌肽中疏水性氨基酸(Ile, Val, Leu, Phe, Met, Ala和Trp)与总氨基酸的比值。通常在抗菌肽分子中,疏水性氨基酸含量较高,以便折叠形成各种两亲性结构和构象。据统计,在APD数据库中,78%的抗菌肽疏水含量在30%~60%之间,疏水含量占50%的抗菌肽最多。抗菌肽的疏水含量从0%至100%都有分布,可以推测疏水含量为0%的抗菌肽(不含疏水性氨基酸)很难与细胞膜结合,但是疏水性为100%的抗菌肽(如

收稿日期:2019-01-08 修回日期:2019-03-22

* 国家自然科学基金(314605678)资助项目

**通讯作者,电子信箱:gou_ping@sina.com

gramicidin)则很难与细胞膜分离^[12]。

1.3 根据电荷分类

根据抗菌肽所带电量可以将其分为阳离子抗菌肽、阴离子抗菌肽及中性抗菌肽。由于大部分抗菌肽分子中含有多个精氨酸和赖氨酸,所以它们在生理条件下带正电荷。据统计,APD3 数据库收录的 2722 条抗菌肽,其中 87% 抗菌肽带正电荷,不带电荷的占 7%,带负电荷的占 6%^[15]。

1.4 根据三级结构分类

依据抗菌肽的三级结构将其分为:(1)线性-螺旋肽;(2)环肽,通常形成 β -折叠结构,有两个或多个二硫

键;(3)既有 α -螺旋,也有 β -折叠结构,由二硫键维系其稳定性;(4)形成发卡或环状结构,分子内含有二硫键;(5)含有重复氨基酸序列(Pro, Gly, Try, His)的线性肽;(6)无序的短肽^[12, 16-17]。

2 抗菌肽的作用机制

抗菌肽具有多种不同的生物学功能,推测抗菌肽应该有多个作用位点及作用机制。目前,抗菌肽的作用机制主要分为两类:膜损伤型和非膜损伤型(图 1)^[4,18]。

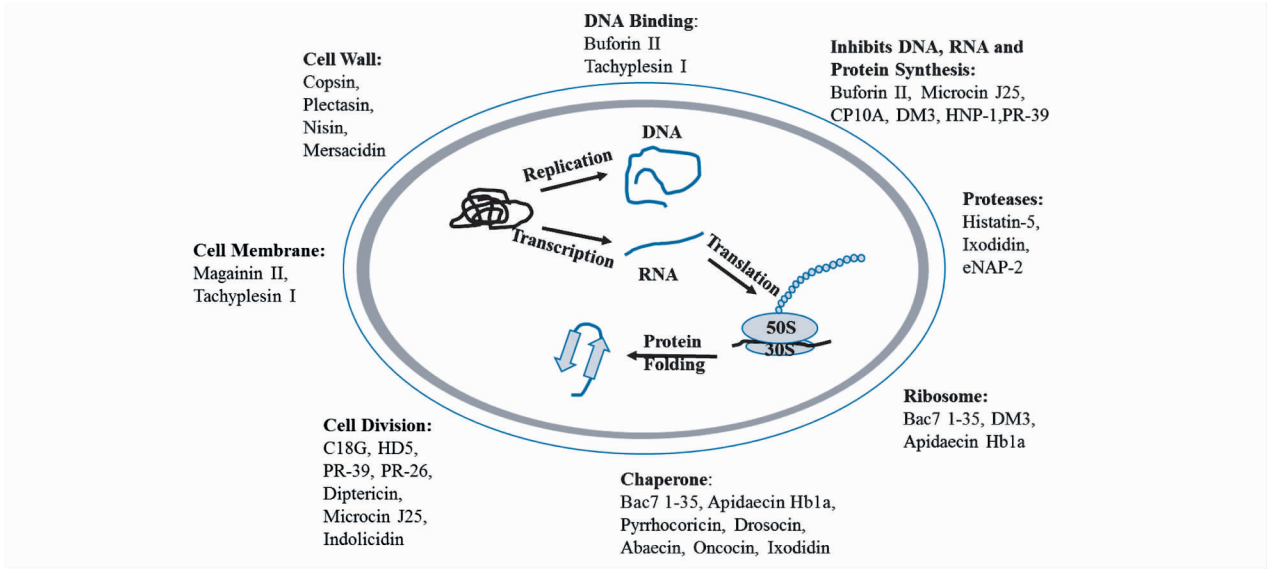


图 1 抗菌肽的作用机制示意图

Fig. 1 Schematic representation of the major pathways targeted by AMPs

2.1 膜损伤型

膜损伤型作用机制包括(1)地毯模型(carpet model):抗菌肽通过折叠形成两亲性构象,聚集在细胞膜表面。一旦聚集在细胞膜表面的抗菌肽达到一定浓度,就会扰乱、破坏磷脂双分子层结构,促使细胞膜崩解^[19];(2)桶板模型(barrel-stave):具有 α -螺旋结构的抗菌肽一旦与细胞膜结合,会促使更多的抗菌肽结合在细胞膜表面,抗菌肽通过螺旋结构中的疏水区域,插入至磷脂双分子层中,形成“桶样”穿膜通道^[20-21];(3)聚集模型(aggregate):抗菌肽聚集在细胞膜表面,达到一定浓度后,向内翻动,与磷脂分子形成肽-脂超分子复合物,从而形成介导脂质和多肽相互耦合的跨膜运输^[22]。(4)环孔模型(toroidal-pore):Sengupta 等^[23]发现在抗菌肽和脂分子的比例达到阈值时,形成穿膜孔

洞。抗菌肽插入细胞膜中,导致细胞膜上的脂分子向内弯曲,多肽与磷脂分子的极性基团相互作用,最终形成跨膜环孔。

普遍认为抗菌肽是通过静电作用吸附于细胞膜表面,抗菌肽的理化性质和细胞膜的组成成分是影响二者相互作用的主要因素。目前研究的较为透彻的是阳离子抗菌肽对细菌的作用机制,带正电荷的抗菌肽极易聚集在革兰氏阴性菌带负电荷的细胞膜表面。随后,通过离子交换机制,阳离子抗菌肽与 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 竞争性地与脂多糖结合,随后,穿过革兰氏阴性菌的细胞膜及细胞壁,破坏细胞结构^[24]。

为了检测抗菌肽的穿膜性,常用磷脂膜模型、脂质体、大单室脂质体,甚至是活细胞。但是,这些模拟抗菌肽作用的模型存在一定的局限性,比如大多数磷脂

膜模型只是模拟了简单的磷脂双分子层,却忽略了很多真实的细胞膜表面结构域,如脂筏结构、膜蛋白和糖脂。此外,一些对抗菌肽作用机制的研究是利用大批、浮游的细菌与抗菌肽的作用,可以观察几分钟内抗菌肽与细菌的作用过程。但是,抗菌肽对细菌的损伤作用是在极短时间内发生的,远远快于大多数批量测量的反应时间,而且,批量分析无法提供精细的亚细胞空间信息^[25]。因此,单一的检测技术无法清晰地阐明抗菌肽的作用机制,需要结合多种技术才能准确地分析抗菌肽的穿膜过程及膜损伤机制。针对抗菌肽如何特异性地与细胞膜结合、插入、调整构象和移位的过程,研究者结合显微镜技术,如免疫透射电子显微镜(TEM)和原子力显微镜(AFM),直接观察抗菌肽是否影响了微生物的结构和形态。通过生物素或者荧光素标记,追踪抗菌肽在某一时刻对单细胞的作用,为抗菌肽的作用时间、序列、与细胞膜结合的特定位点和亚细胞定位提供了详细的图像^[25]。

2.2 非膜损伤型

虽然抗菌肽可以通过形成离子通道、穿膜孔洞、促进膜崩解,造成细胞的裂解,但是,越来越多的研究表明抗菌肽还存在其他的作用机制,包括作用于胞内靶点或者在不裂解膜结构的情况下,破坏细胞生命进程中的某些关键过程。Patrzykat^[26]发现来源于 pleurocidin 和 dermaseptin 的杂合抗菌肽 P-Der,在使用浓度为半致死浓度(MIC)5倍时,能有效地抑制大肠杆菌菌落的形成,同时没有破坏细菌的细胞膜。但是,当 P-Der 使用浓度达到 MIC 的 10 倍时,多肽能立即引起细胞膜的去极化现象。由此可见,抗菌肽并不是通过单一的作用机制抑杀细胞的,抗菌肽的浓度可以影响其作用机制。研究者提出抗菌肽在抑制细菌菌落形成与细胞膜通透性发生变化之间存在短暂的时间差,即细胞死亡与细胞膜异常并不是同时发生的,论证抗菌肽非膜损伤机制的存在。在膜损伤型机制中,微生物膜通透性的变化与细胞死亡几乎是瞬时发生的,但是在非膜损伤机制中,先检测到细胞死亡,之后才是细胞膜的变化,似乎细胞膜通透性的改变会进一步促进细胞的凋亡,此现象与很多作用于胞内靶位点的传统抗生素类似^[27-28]。

相比于抗菌肽膜损伤型作用机制,关于非膜损伤型作用机制的文献并不是很多^[4]。抗菌肽非膜损伤型作用机制包括:(1)与 DNA 结合,抑制 DNA 的转录/复制。理论上,阳离子抗菌肽与带负电荷的核酸分子极

易通过静电作用结合。Lan 等^[29]利用圆二色谱 CD 和荧光标记发现酰胺化的 buforin II 与双链 DNA 有极强的亲和性,而且与双链 DNA 结合的 buforin II 并不呈现 α -螺旋结构,此结构在膜裂解机制中发挥重要作用。通过体外凝胶阻滞实验可以验证抗菌肽与 DNA 的结合,随着抗菌肽浓度的增加,与抗菌肽结合的 DNA 很难迁移^[30]。但是,也有研究者指出体外凝胶阻滞实验只是非特异性地体外结合实验,不能验证抗菌肽在细胞内与 DNA 的作用机制^[18]。另外,Sharma 等^[31]通过合成抗菌肽 SAMPs,检测 SAMPs 对不同细胞的抗菌活性。结果显示 SAMPs 进入分枝杆菌和哺乳动物细胞,作用于分枝杆菌基因组 DNA,最终导致细胞死亡。(2)抑制蛋白合成及折叠。细菌内蛋白质的合成,首先是 DNA 转录成 mRNA,mRNA 翻译成多肽链,然后在胞内分子伴侣的协助下折叠,形成稳定的、有功能的蛋白质。在蛋白质合成过程中,抗菌肽作用于蛋白质合成中的关键的酶或者分子,导致蛋白质合成受阻或不能正确折叠,最终细菌死亡。研究较为透彻的是富含脯氨酸的抗菌肽(PR-AMPs),由于脯氨酸含量较高,PR-AMPs 通常呈伸展的结构,或多聚脯氨酸螺旋 II 结构。来源于昆虫和哺乳动物的 PR-AMPs 可与细菌核糖体亚基结合,抑制蛋白的合成^[32]。富含脯氨酸的抗菌肽 PR-39 具有蛋白水解酶活性,Boman 等^[33]发现 25 $\mu\text{mol/L}$ 的 PR-39 不仅可以抑制蛋白的合成,还可诱导与 DNA 复制相关的蛋白降解,从而抑制 DNA 合成。也有研究指出 PR-39 能够抑制蛋白翻译、核酸转运和代谢等多条代谢途径。抗菌肽除了影响蛋白质翻译的过程,还可以作用于分子伴侣,阻碍蛋白质的正确折叠。研究发现 pyrrocoricin 和 drosocin 可以促使细菌内的分子伴侣 DnaK(热休克蛋白 70,Hsp70)结构域永久性闭合,或者竞争性地结合于 DnaK 的底物结合域,导致 DnaK 无法协助折叠错误的蛋白质重新折叠。而且,pyrrocoricin 和 drosocin 可以识别细菌内 DnaK 和人体内 Hsp70 立体构象的差异,选择性地与 DnaK 结合,从而避免对人体产生毒性作用^[34-36]。(3)抑制细胞壁的形成。细胞壁中的网状肽聚糖不仅是维持细菌完整及存活的重要因子,也是很多抗菌肽作用的靶位点^[37]。抗菌肽 Copsin 分子中含有 6 个二硫键使得 Copsin 极其稳定,对蛋白水解酶、pH 和温度具有较高的耐受性。Copsin 通过与类脂 II 前体结合,抑制细胞壁的合成^[38]。另外,Mersacidin 和 Nisin 同属于球状羊毛硫抗生素,都可以与类脂 II 结合,Mersacidin 抑制细胞壁合

成,而 Nisin 会在细胞膜上形成孔洞^[39-40]。(4)抑制酶活性。阳离子富组蛋白 5(Histatin 5)是一类抗真菌肽,主要由唾液腺分泌,可以作用于白色念珠菌内多个靶位点,诱导氧化应激和线粒体功能失调,杀死白色念珠菌。同时,还发现 Histatin 5 能有效地抑制宿主/细菌分泌的蛋白酶活性。Gusman 等^[41]发现 Histatin 5 可以抑制人体基质金属蛋白酶 2(MMP-2)和基质金属蛋白酶 9(MMP-9)。基质金属蛋白酶的主要功能是分解细胞外基质,其次,它们也参与多项细胞活动,被认为与牙周炎和肿瘤迁移等疾病相关^[42]。所以,Histatin 5 可以作为潜在的药物,抑制宿主/细菌分泌的蛋白水解酶降解细胞外基质,达到治疗牙周炎或者抑制肿瘤转移的效果。(5)影响细胞分裂。研究发现细菌在遭受多种逆境,如 DNA 受损、暴露于抗菌成分中、高静水压力和高渗透压环境时,细胞形态呈丝状^[43]。Ishikawa 等^[44]发现经抗菌肽 diptericin 处理后的大肠杆菌形态会发生变化,变得更加细长,diptericin 可能影响了大肠杆菌的分裂。细菌在遭受逆境时,选择减缓分裂增殖和细菌呈丝状是一种自我保护机制,可以抵御逆境,产生耐受性,比如大肠杆菌可以在 DNA 受到损伤时,启动 SOS 修复,并伴随着细胞分裂抑制子 SulA 上调表达,从而避免细菌在受损染色体被修复和分离之前进行分裂^[45]。同样,Yadavalli 等^[46]发现抗菌肽 C18G 能够激活细菌的 PhoQ/PhoP 信号系统,细菌隔膜形成受到抑制,细菌分裂减缓,呈丝状,最终对抗菌肽产生一定的耐受性。越来越多的研究者认为抗菌肽可以作用于多个靶位点,通过多种途径达到抑杀细胞的作用。Ho 等^[47]分别对 4 种抗菌肽(Bac7, LfcinB, P-Der, PR-39)的胞内作用蛋白质进行检测,蛋白质微阵列分析显示在大肠杆菌中,LfcinB 有 231 个作用蛋白质。对作用蛋白的生物学功能分析发现,抗菌肽可以影响 DNA 合成、在不破坏膜结构的情况下抑制细菌生长和大分子的合成。

3 抗菌肽的耐受性

由于抗菌肽在抑杀微生物时,通常不采用单一的作用机制,同时存在多个作用靶点,所以细菌很难对抗菌肽产生耐受性。正是在这种观点的驱使下,很多研究者侧重于抗菌肽的药用价值,忽略了病原菌可能会对抗菌肽产生获得性耐受性。最近体外研究发现了一些对抗菌肽产生耐受性的病原菌,突变株甚至对抗菌肽有高耐受性。因此,对抗菌肽耐受性的研究逐渐被研究者所关注。

3.1 细菌对抗菌肽的内在耐受性

细菌可以通过被动或者诱导机制对抗菌肽产生内在耐受性。

3.1.1 革兰氏阴性菌细胞膜的改变 细菌通过改变细胞膜,对抗菌肽产生耐受性。研究者发现外界环境的刺激,如饥饿、低 pH、低镁、高铁,或者各种宿主组织的环境,都可以通过双组分调控系统 PhoP/PhoQ、PmrA/PmrB 和 Rcs,诱导 *S. Typhimurium* 细胞表面的脂多糖(LPS)发生多种改变,保证菌体存活。伤寒杆菌(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium)在操纵子 *pmrCAB* 和 *pmrHFIJKLM* 调控下,利用 4-氨基阿拉伯糖(4-aminoarabinose)修饰脂质 A,减少 LPS 所带的负电荷,从而降低了抗菌肽的吸附^[48]。

3.1.2 革兰氏阳性菌细胞膜的改变 革兰氏阳性菌利用带正电荷的分子修饰细胞壁中带负电的磷壁酸,减弱细菌和抗菌肽之间的静电作用,从而对抗菌肽产生耐受性^[49]。除了对细胞膜进行修饰,细菌还采用外排抗菌肽和分泌蛋白水解酶的方式,对抗菌肽产生耐受性^[49]。

3.2 细菌对抗菌肽的获得性耐受性

一些细菌病原菌对抗菌肽获得性耐受性的分子机制正在被逐渐解析。目前,筛选抗菌肽耐受性突变株的方法主要有两种:连续传代法和琼脂板筛选法。(1)在连续传代法中,细菌培养在含有抗菌肽的培养基中,其中抗菌肽的浓度接近 MIC。随着细菌的增殖,抗菌肽浓度逐渐增高,耐受抗菌肽的突变株逐渐增多;(2)在琼脂板筛选法中,琼脂板中抗菌肽的浓度高于 MIC,最后,筛选存活的细菌。Lofton 等^[50]用三种抗菌肽 LL-37、CNY100HL 和 WGH 在 *S. Typhimurium* 中检测菌体对抗菌肽获得性耐受水平。在连续增殖 ~500 代时得到稳定的耐受株,它们对抗菌肽的耐受性提高了 2~4 倍。对耐受株的分子机制检测发现菌体在两组分调控系统(*pmrB/phoP*)或者 LPS 生物合成途径中存在分子突变,*phoP* 中一个氨基酸的替换导致 *S. Typhimurium* 在体外实验中,对三种受试抗菌肽都具备类似的耐受性。在脓血症小鼠模型中,突变株对宿主的毒性作用并没有减弱。同样,Sun 等^[51]利用琼脂板筛选法获得对抗菌肽 colistin 耐受的 *S. Typhimurium*,耐受株对 colistin 的 MIC 是野生型的 10 倍,甚至是 50 倍。在脓血症小鼠模型中,耐受株对 colistin 的耐受浓度提高了 2~35 倍。对耐受株的分子机制检测结果表明,在超过一半的耐受株双组分调控系统中,*pmrA/pmrB* 出现了不

同的错义突变,而且,还检测到 *pmrH* 基因的上调表达,说明双组分调控系统出现了调控失调^[49, 52]。

4 抗菌肽的应用及挑战

在过去的几十年中,抗菌肽独特的结构和多种作用机制被逐步解析出来,研究者致力于将抗菌肽应用于不同领域。目前,多种商品化抗菌肽已经用于食品领域,如 Nisaplin[®]、MicroGARD[®]、BioSafe[™]、HOLDBAC[™]、ALCMix1 等产品。无论是作为食品添加剂,还是与食品包装材料整合,其中的抗菌肽都发挥了食品保鲜、防腐抗菌的功能^[53-54]。在抗菌肽应用于人类健康护理和疾病治疗领域,研究者投入了极大的努力,进入临床试验的人工合成抗菌肽包括: Pexiganan acetate (MSI-78) 治疗糖尿病足部溃疡、hLF1-11 (AM Pharma) 防止造血干细胞移植时,中性粒细胞减少引起的真菌和细菌感染、Omiganan pentahydrochloride 可抗细菌和真菌,防止导管引起的感染及治疗丘疹脓疱性酒糟鼻、Isegranin (IB-367) 治疗接受放疗的头颈癌患者的口腔黏膜炎、rBPI21 防止脑膜炎等。但是,受制于严格的临床试验,商品化的抗菌肽药物并不多^[55]。

4.1 抗菌肽在医药领域的应用及挑战

目前,由于各种耐药菌株的不断涌现,研究者对抗菌肽临床应用的研究也越来越深入,抗菌肽被认为是最有前景的、能够替代传统抗生素的新型药物。迄今为止,仅有少数抗菌肽被应用于临床治疗,其中包括 polymyxin B 和 colistin (polymyxin E)。polymyxin 被用于治疗支气管肺炎、脑膜炎、耐药性革兰氏阴性菌引起的感染。但是,发现静脉注射 polymyxin 也会对肾和神经造成毒副作用。除了直接注射抗菌肽来抑制感染,研究者还试图通过刺激宿主先天性免疫系统分泌抗菌肽,控制外源病原体的感染。例如在膳食中加入维生素 D₃ 刺激人体产生 LL-37 和 β -defensin 2。但是,通过人工刺激,促使机体产生的抗菌肽,无法被精确的定量和控制,很可能使得病原菌长时间暴露在高浓度抗菌肽下,在一定程度上促进病原菌产生抗菌肽耐受性^[56]。除了抗菌肽具有一定毒副作用外,研究者还发现抗菌肽对外界环境较为敏感,这使得抗菌肽在体外实验和体内实验中的抗菌效果存在一定的差异。

目前,很多研究者致力于开发合成新型抗菌肽,但是,即使这些抗菌肽具有不同的结构和作用方式,一些具有耐药性的病原菌也能够对抗菌肽产生普遍耐受性。此外,抗菌肽不稳定,易被蛋白水解酶降解、纯化

成本高、存在毒副作用等,这些都是抗菌肽在医药领域推广所面临的难题^[49, 57]。

4.2 抗菌肽在食品工业中的应用与挑战

食品卫生安全一直是全球所关注的问题,它对食品加工工艺提出了严格的要求,既要求减少加工过程,最大程度的保持食品天然营养成分不被破坏,同时要求在一定保质期内,食品的新鲜和可食用性,最低需求的加入各种化学添加剂。在多种加工工艺中,添加生物保鲜剂被认为是最有效的手段,其中,细菌素被广泛应用于食物保存中。细菌素是一类由核糖体合成的细菌抗菌多肽,大多数细菌素能够抑杀与产生菌相似的菌株。目前已经从多种细菌中分离获得细菌素,乳酸菌是最常用的分离菌株。由于乳酸菌存在于天然食物中,所以由它产生的细菌素作为天然抗菌肽用于食品保鲜,被人们广泛接受。由乳酸乳球菌乳酸亚种 (*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*) 产生的乳酸链球菌素 Nisin,是第一个被批准应用于食品中的细菌素。从乳制品到海产品,Nisin 对多种食物病原菌都有抑杀效果,但是 Nisin 的活性会受其他因素的影响,如温度和其他食品添加剂。所以,在使用 Nisin 之前,应检测 Nisin 在真实环境中的抗菌活性。此外,很多存在于乳制品中的天然抗菌肽也被逐渐开发,用于食品防腐剂,包括乳铁蛋白,它是一种天然存在于乳汁中的运铁蛋白。研究表明,来源于乳铁蛋白的乳铁蛋白多肽具有很高的抗菌活性。但是,细菌素同样面临不稳定,会被蛋白水解酶降解,或者与食物中的成分相互作用导致抗菌活性降低等问题^[58]。

4.3 抗菌肽在农作物中的应用与挑战

农作物的生长与食品安全息息相关,然而,为了保证农作物的产量,人们在种植过程中,不惜使用化学杀虫剂以保证农作物免受病虫害的影响。如果不加节制的使用化学杀虫剂,不仅会污染环境、损害人们的健康,也会摧毁作物本身的防御体系、催生对化学杀虫剂高耐受性的病原菌。研究者发现将抗菌肽基因转化入植物中,筛选的抗菌肽转基因植物能够耐受细菌和真菌病原菌的侵害。目前,已经获得表达植物防御素 (defensins) 的转基因水稻、小麦、香蕉、“Egusi”甜瓜、番茄、花生和烟草。同时,研究表明在烟草中转入昆虫抗菌肽 defensin (*G. mellonella* gallerimycin) 和 cecropin (sarcotoxin-IA) 也能帮助转基因植株抵御病原性真菌的侵害。但是,转基因植物表达的抗菌肽可能会对自身的基因表达产生一定影响,从而具有毒副作用^[59]。

4.4 抗菌肽在疾病传播中的应用和挑战

研究者将抗菌肽基因插入植物中,协助转基因植株对病原性细菌和真菌产生一定耐受性;将抗菌肽基因导入动物体内,抑制疾病的传播。Kokoza 等^[60]将 defensin-A 基因插入黄热病蚊子 (*A. aegypti*) 卵黄蛋白原 (Vg) 启动子下游,一旦蚊子吸食血液后, Vg 启动子可以启动抗菌肽的表达,有效地抑制寄生虫的繁殖,抑制了疟疾或其他虫媒疾病的传播。随后, Kokoza 等^[61]又在 *A. aegypti* 体内共表达 defensin-A 和 cecropin-A。

4.5 抗菌肽在畜牧业中的应用及挑战

在畜牧业中,大量抗生素被用于疾病的防治。如果家畜对抗生素产生耐药性,耐药性的病原菌可能感染人体,威胁人类健康。使用抗菌肽替代抗生素被广泛关注,已有报道称抗菌肽能有效地抑杀传染性乳腺炎的病原体金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)。Kerr 等^[62]在转溶葡萄球菌酶基因的小鼠乳腺中检测到具有生物活性的溶葡萄球菌酶,能够有效地抑制金黄色葡萄球菌。此外,也有研究者将溶葡萄球菌酶基因通过腺病毒转染至山羊乳腺中^[63]。甚至通过转基因奶牛,产生含有溶葡萄球菌酶的牛奶,防治由金黄色葡萄球菌引起的乳腺炎^[59,64]。

虽然抗菌肽在畜牧业中的抗菌效果显著,但是如何通过简便、经济的方法获得高纯度和生物活性的抗菌肽,成为大规模生产抗菌肽的难题。色谱层析纯化法和化学合成法对成本和技术要求高,从动植物中提纯抗菌肽过程繁琐,产率不高。很多研究者纯化重组的抗菌肽、采用免疫调控和转基因方法降低成本。Sousa 等^[65]以类弹性蛋白多肽 (ELP) 为标签,将重组抗菌肽的产量提高了 50 倍。因为 ELP 对温度敏感,一旦温度在相变温度以上, ELP 可以聚集析出,当温度降至相变温度以下, ELP 是高度可溶的,此过程可逆,因此, ELP 被广泛用于纯化融合蛋白^[66]。

4.6 抗菌肽在水产养殖中的应用与挑战

在水产养殖系统中,养殖户一般遵循“预防优于治疗”的做法。虽然各种抗生素和疫苗能够抑制疾病的爆发,但是,在高密度水产养殖体系中,依然存在很高的死亡率。此外,随着抗生素使用量的增加,水产动物的免疫系统很可能受到破坏,最终无法抵御疾病的传播。由于越来越多的致病菌产生了耐药性,这些耐药性细菌可能通过水产品对人类健康造成危害。1995 年,第一个鱼类抗菌肽被纯化出来,在此后的二十几年间,研究者从不同鱼类中分离鉴定出多个抗菌肽,包括

Piscidins, Hepcidins, Defensins 和 Cathelicidins^[67]。Cheng 等^[68]发现枯草芽孢杆菌 E20 发酵豆粕 (*Bacillus subtilis* E20-fermented soybean meal, FSBM) 生产的抗菌肽可以有效抑杀溶藻弧菌 (VA) 和副溶血性弧菌 (VP),对 VA 和 VP 的 MIC 分别是 72.5 和 72.5 $\mu\text{mol/L}$ 。将此抗菌肽添加至养殖饲料中,增强了凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 抵御 VP 的感染。但是它对其他致病菌,如 *L. Garvieae*, *D. Hansenii* 和 *Streptococcus* sp., 抑杀效果并不显著。在水产养殖中,使用抗菌肽也应谨慎、适量,高浓度的抗菌肽会对水产动物的免疫系统产生负面影响,促使它们无法抵御致病菌的感染;另一方面,微生物极有可能会对抗菌肽产生耐受性,从而削弱抗菌肽的抗菌活性。

5 抗菌肽的前景与挑战

抗菌肽不仅可以协助宿主抵御外源微生物,而且在细胞凋亡、伤口愈合和免疫调控过程中,也发挥一定功能。研究表明,人类一些疾病与体内抗菌肽的异常表达有关^[69]。基于抗菌肽广谱的抗菌活性及独特的作用方式,越来越多的研究者投入到抗菌肽的研究中,包括抗菌肽的作用机制、生物活性及体外优化各种抗菌肽的表达。抗菌肽的研究催生了多种商品化的抗菌肽,被应用到各行各业^[70-71]。目前,人们已经不单单满足应用纯化的抗菌肽,转抗菌肽基因的动、植物被不断地改造出来。在利用这些转基因动、植物产生抗菌肽的同时,也需要评估它们对于生态环境及人类健康所造成的影响。这不仅要求研究者在实验阶段尽可能地完整评估转基因动植物的生物安全性,更要求专门的机构组织能够采用统一、可靠的标准来监测转基因动植物的生物安全性。

自然界的精妙处在于随着环境的改变,生物也会随之发展和进化。即便是抗菌肽具有多种作用机制、多重作用靶点,但是处于抗菌肽作用环境中的微生物也会逐渐进化。因此,合理、有效地使用抗菌肽,尽可能减小微生物对抗菌肽产生耐受性的风险,为抗菌肽的推广使用拓展更大的空间^[72]。

参考文献

- [1] Steiner H, Hultmark D, Engström Å, et al. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 1981, 292(5820): 246-248.
- [2] Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from

- Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 5449-5453.
- [3] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 2002, 415(6870): 389-395.
 - [4] Le C F, Fang C M, Sekaran S D. Beyond membrane-lytic: intracellular targeting mechanisms by antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017, 61(4): e02340-16.
 - [5] Brogden K A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(3): 238-250.
 - [6] Wang Y D, Kung C W, Chen J Y. Antiviral activity by fish antimicrobial peptides of epinecidin-1 and hepcidin 1-5 against nervous necrosis virus in medaka. *Peptides*, 2010, 31(6): 1026-1033.
 - [7] Lupetti A, Van Dissel J, Brouwer C, et al. Human antimicrobial peptides' antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2008, 27(11): 1125-1129.
 - [8] Vizioli J, Salzert M. Antimicrobial peptides versus parasitic infections? *Trends in Parasitology*, 2002, 18(11): 475-476.
 - [9] Hoskin D W, Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2008, 1778(2): 357-375.
 - [10] Amer L S, Bishop B M, van Hoek M L. Antimicrobial and antibiofilm activity of cathelicidins and short, synthetic peptides against *Francisella*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 396(2): 246-251.
 - [11] Hilchie A L, Wuerth K, Hancock R E. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Nature Chemical Biology*, 2013, 9(12): 761-768.
 - [12] Wang G, Li X, Wang Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research*, 2015, 44(D1): D1087-D1093.
 - [13] Fan L, Sun J, Zhou M, et al. DRAMP: a comprehensive data repository of antimicrobial peptides. *Scientific Reports*, 2016, 6: 24482.
 - [14] Di Luca M, Maccari G, Maisetta G, et al. BaAMPs: the database of biofilm-active antimicrobial peptides. *Biofouling*, 2015, 31(2): 193-199.
 - [15] Wang G. Improved methods for classification, prediction, and design of antimicrobial peptides. *Computational Peptidology*, 2015, 43-66.
 - [16] Menegueti B T, Machado L d S, Oshiro K G, et al. Antimicrobial peptides from fruits and their potential use as biotechnological tools-a review and outlook. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 7: 2136.
 - [17] Wang G. Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategies. 2nd ed. UK: CABI, 2017: 1-261.
 - [18] Scocchi M, Mardirossian M, Runti G, et al. Non-membrane permeabilizing modes of action of antimicrobial peptides on bacteria. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2016, 16(1): 76-88.
 - [19] Gaspar D, Veiga A S, Castanho M A. From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 294.
 - [20] Reddy K, Yedery R, Aranha C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2004, 24(6): 536-547.
 - [21] Yang L, Harroun T A, Weiss T M, et al. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophysical Journal*, 2001, 81(3): 1475-1485.
 - [22] Wu M, Maier E, Benz R, et al. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 1999, 38(22): 7235-7242.
 - [23] Sengupta D, Leontiadou H, Mark A E, et al. Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2008, 1778(10): 2308-2317.
 - [24] Bechinger B, Gorr S U. Antimicrobial peptides: mechanisms of action and resistance. *Journal of Dental Research*, 2017, 96(3): 254-260.
 - [25] Choi H, Rangarajan N, Weisshaar J C. Lights, camera, action! Antimicrobial peptide mechanisms imaged in space and time. *Trends in Microbiology*, 2016, 24(2): 111-122.
 - [26] Patrzykat A, Friedrich C L, Zhang L, et al. Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, 46(3): 605-614.
 - [27] Schneider T, Kruse T, Wimmer R, et al. Plectasin, a fungal defensin, targets the bacterial cell wall precursor Lipid II. *Science*, 2010, 328(5982): 1168-1172.
 - [28] Yount N Y, Bayer A S, Xiong Y Q, et al. Advances in antimicrobial peptide immunobiology. *Peptide Science: Original Research on Biomolecules*, 2006, 84(5): 435-458.
 - [29] Lan Y, Ye Y, Kozłowska J, et al. Structural contributions to the intracellular targeting strategies of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2010, 1798(10): 1934-1943.
 - [30] Gottschalk S, Thomsen L E. The interaction of antimicrobial peptides with the membrane and intracellular targets of *Staphylococcus aureus* investigated by ATP leakage, DNA-binding analysis, and the expression of a LexA-controlled gene, recA. *Antimicrobial Peptides*, 2017, 297-305.
 - [31] Sharma A, Pohane A A, Bansal S, et al. Cell penetrating synthetic antimicrobial peptides (SAMPs) exhibiting potent and selective killing of *Mycobacterium* by targeting its DNA. *Chemistry-A European Journal*, 2015, 21(9): 3540-3545.
 - [32] Scocchi M, Tossi A, Gennaro R. Proline-rich antimicrobial

- peptides; converging to a non-lytic mechanism of action. Cellular and Molecular Life Sciences, 2011, 68(13): 2317-2330.
- [33] Boman H G, Agerberth B, Boman A. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. Infection and Immunity, 1993, 61(7): 2978-2984.
- [34] Otvos L, O I, Rogers M E, et al. Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. Biochemistry, 2000, 39(46): 14150-14159.
- [35] Kragol G, Lovas S, Varadi G, et al. The antibacterial peptide pyrrolicorin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. Biochemistry, 2001, 40(10): 3016-3026.
- [36] Chesnokova L S, Slepnev S V, Witt S N. The insect antimicrobial peptide, 1-pyrrolicorin, binds to and stimulates the ATPase activity of both wild-type and lidless DnaK. FEBS Letters, 2004, 565(1-3): 65-69.
- [37] Koch A L. Bacterial wall as target for attack past, present, and future research. Clinical Microbiology Reviews, 2003, 16(4): 673-687.
- [38] Essig A, Hofmann D, Münch D, et al. Copsin, a novel peptide-based fungal antibiotic interfering with the peptidoglycan synthesis. Journal of Biological Chemistry, 2014: jbc. M114. 599878.
- [39] Bröt z H, Bierbaum G, Leopold K, et al. The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1998, 42(1): 154-160.
- [40] Breukink E, Kruijff B. Lipid II as a target for antibiotics. Nature Reviews Drug Discovery, 2006, 5(4): 321-323.
- [41] Gusman H, Grogan J, Kagan H M, et al. Salivary histatin 5 is a potent competitive inhibitor of the cysteine proteinase clostripain. FEBS Letters, 2001, 489(1): 97-100.
- [42] Puri S, Edgerton M. How does it kill-understanding the candidicidal mechanism of salivary Histatin 5. Eukaryotic Cell, 2014, 13(8): 958-964.
- [43] Pratt Z L, Chen B, Czuprynski C J, et al. Characterization of osmotic-induced filaments of *Salmonella enterica*. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(18): 6704-6713.
- [44] Ishikawa M, Kubo T, Natori S. Purification and characterization of a dipterin homologue from *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). Biochemical Journal, 1992, 287(2): 573-578.
- [45] Bi E, Lutkenhaus J. Cell division inhibitors SulA and MinCD prevent formation of the FtsZ ring. Journal of Bacteriology, 1993, 175(4): 1118-1125.
- [46] Yadavalli S S, Carey J N, Leibman R S, et al. Antimicrobial peptides trigger a division block in *Escherichia coli* through stimulation of a signalling system. Nature Communications, 2016, 7: 12340.
- [47] Ho Y H, Shah P, Chen Y W, et al. Systematic analysis of intracellular-targeting antimicrobial peptides, bactenecin 7, hybrid of pleurocidin and dermaseptin, proline-arginine-rich peptide, and lactoferricin B, by using *Escherichia coli* proteome microarrays. Molecular & Cellular Proteomics 2016: mcp. M115. 054999.
- [48] Gunn J S, Ryan S S, Van Velkinburgh J C, et al. Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. Infection and Immunity, 2000, 68(11): 6139-6146.
- [49] Andersson D I, Hughes D, Kubicek-Sutherland J Z. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. Drug Resistance Updates, 2016, 26: 43-57.
- [50] Lofton H, Anwar N, Rhen M, et al. Fitness of *Salmonella* mutants resistant to antimicrobial peptides. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2014, 70(2): 432-440.
- [51] Sun S, Negrea A, Rhen M, et al. Genetic analysis of colistin resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(6): 2298-2305.
- [52] Moffatt J H, Harper M, Harrison P, et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010, 54(12): 4971-4977.
- [53] Chikindas M L, Weeks R, Drider D, et al. Functions and emerging applications of bacteriocins. Current Opinion in Biotechnology, 2018, 49: 23-28.
- [54] Santos J C P, Sousa R C S, Otoni C G, et al. Nisin and other antimicrobial peptides: production, mechanisms of action, and application in active food packaging. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2018, 48: 179-194.
- [55] Dutta P, Das S. Mammalian antimicrobial peptides: promising therapeutic targets against infection and chronic inflammation. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2016, 16(1): 99-129.
- [56] Landman D, Georgescu C, Martin D A, et al. Polymyxins revisited. Clinical Microbiology Reviews, 2008, 21(3): 449-465.
- [57] Marr A K, Gooderham W J, Hancock R E. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. Current Opinion in Pharmacology, 2006, 6(5): 468-472.
- [58] da Silva Malheiros P, Doroit D J, Brandelli A. Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. Trends in Food Science & Technology, 2010, 21(6): 284-292.
- [59] Keymanesh K, Soltani S, Sardari S. Application of antimicrobial peptides in agriculture and food industry. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 25(6): 933-944.
- [60] Kokoza V, Ahmed A, Cho W L, et al. Engineering blood meal-activated systemic immunity in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, 97(16): 9144-9149.
- [61] Kokoza V, Ahmed A, Shin S W, et al. Blocking of *Plasmodium* transmission by cooperative action of Cecropin A and Defensin A

- in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107(18): 8111-8116.
- [62] Kerr D E, Plaut K, Bramley A J, et al. Lysostaphin expression in mammary glands confers protection against staphylococcal infection in transgenic mice. Nature Biotechnology, 2001, 19(1): 66-70.
- [63] Fan W, Plaut K, Bramley A, et al. Adenoviral-mediated transfer of a lysostaphin gene into the goat mammary gland. Journal of Dairy Science, 2002, 85(7): 1709-1716.
- [64] 王曦, 陈熙明, 浦铜良. 溶葡萄球菌酶高效表达与应用. 中国生物工程杂志 2017, 37(9): 118-125.
Wang X, Chen X M, Pu T L. Progress on high efficient expression and application of lysostaphin. China Biotechnology 2017, 37(9): 118-125.
- [65] Sousa D A, Mulder K C, Nobre K S, et al. Production of a polar fish antimicrobial peptide in *Escherichia coli* using an ELP-intein tag. Journal of Biotechnology, 2016, 234: 83-89.
- [66] Tang X. Elastin-like polypeptides as thermosensitive polymer system. Advanced Materials Research, 2014, 898:296-299.
- [67] Paria A, Vinay T, Gupta S K, et al. Antimicrobial peptides: a promising future alternative to antibiotics in aquaculture. World Aquaculture, 2018: 67-69.
- [68] Cheng A C, Lin H L, Shiu Y L, et al. Isolation and characterization of antimicrobial peptides derived from *Bacillus subtilis* E20-fermented soybean meal and its use for preventing *Vibrio* infection in shrimp aquaculture. Fish Shellfish Immunology, 2017, 67: 270-279.
- [69] Lai Y, Gallo R L. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. Trends in Immunology, 2009, 30(3): 131-141.
- [70] 唐馨, 王慧, 热西力, 等. 新疆家蚕抗菌肽在毕赤酵母中表达及活性研究. 生物技术, 2011, 21(2): 26-31.
Tang X, Wang H, Kelaimu R X L, et al. Molecular cloning, expression of Cecropin -XJ gene from silkworm and antibacterial activity in *Pichia pastoris*. Biotechnology, 2011, 21(2): 26-31.
- [71] 唐馨, 毛新芳, 热西力, 等. 黄粉虫抗菌肽 TmAMP3 在大肠杆菌中的高效表达及活性检测. 昆虫学报, 2011, 54(10): 1111-1117.
Tang X, Mao X F, Kelaimu R X L, et al. High-level expression and function assay of antimicrobial peptide TmAMP3 of *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae, Coleoptera) in *Escherichia coli*. Acta Entomologica Sinica, 2011, 54(10): 1111-1117.
- [72] Yeaman M R, Yount N Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. Pharmacological Reviews, 2003, 55(1): 27-55.

Antimicrobial Peptides: Current Status and Future Challenges

TANG Xin^{1,2} MAO Xin-fang³ MA Bin-yun² GOU Ping¹

(1 College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Ürümqi 830046, China)

(2 Keck school of Medicine, University of Southern California, Los Angeles 90033, United States)

(3 School of Chemical Engineering, Sichuan University of Science and Engineering, Zigong 643000, China)

Abstract Antimicrobial peptides (AMPs) are produced in various living organisms as first-line host defenses against potential pathogenic microbes in their surroundings. Pioneering studies showed that AMPs can directly interfere with the integrity of the bacterial cell membrane and cell wall through membrane-disruptive mechanism. In addition to interact with membrane, there are increasing evidence to indicate that AMPs have intracellular targets to achieve efficient killing, including nucleic acids binding, inhibition of protein synthesis and protein-folding, inhibition of cell wall biosynthesis, inhibition of protease and cell division. Due to unique action mechanisms and broad-spectrum of activity, there are continued efforts in exploiting potential applications of AMPs in different area. However, some issues need to be resolved before AMPs be widely used, like AMPs stability, decreased antimicrobial activity and AMPs resistance. In this review, it will be mentioned that current knowledge and recent progress in AMPs action mechanisms, especially non-lytic features, mechanism of AMPs resistance and the potential problems associated with AMPs applications.

Key words Antimicrobial peptides Non-membrane-disruptive mechanism Antibacterial mechanism Resistance