

DOI:10.13350/j.cjpb.240202

• 论著 •

## 蝎毒素抗菌肽 CeAP1 的生物信息学分析与生物活性鉴定\*

敖日格乐<sup>1,2,\*</sup>, 胡和珠拉<sup>1,2</sup>, 胡伊力格其<sup>1</sup>, 曾宪春<sup>3</sup>(1. 内蒙古民族大学蒙医药学院, 内蒙古通辽 028043; 2. 国家药品监督管理局中药(蒙药)质量控制重点实验室;  
3. 中国地质大学(武汉)生物地质与环境地质国家重点实验室)

**【摘要】** 目的 获得蝎毒素抗菌肽基因 CeAP1 并鉴定其编码多肽生物活性。方法 采用生物信息学方法从墨西哥雕像木蝎(*Centruroides exilicauda*)基因组数据中筛选得到1个新的短链抗菌肽基因 CeAP1, 其成熟肽序列由17个氨基酸残基组成, 二级结构呈现为 $\alpha$ -螺旋结构, 是一种两性亲 $\alpha$ -螺旋型阳离子抗菌肽。采用生物信息学软件分析该基因及其编码多肽的结构等生物学特征, 并研究其生物活性。结果 抗菌肽 CeAP1 具有广谱抗菌活性, 对金黄色葡萄球菌和巨大芽孢杆菌的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)值分别为16.0  $\mu\text{mol/L}$  和32.0  $\mu\text{mol/L}$ ; 尤其是对临床分离的多重耐药革兰阳性菌耐万古霉素肠球菌(vancomycin-resistant *Enterococcus*, VRE)和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)均具有较强的抑菌活性, 其中对 VRE E156 和 VRE E161 菌株的 MIC 值均为16.0  $\mu\text{mol/L}$ ; 对 MRSA 16436 和 MRSA 16559 菌株的 MIC 值均为32.0  $\mu\text{mol/L}$ , 并且对人的红细胞有较低的溶血活性。此外, 在4 $\times$ MIC浓度下, CeAP1 可在15 min内完全杀死所有培养的 MRSA 16436 菌株。结论 抗菌肽 CeAP1 对耐万古霉素肠球菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌具有较强的抗菌活性, 可能用于治疗多重耐药菌感染的药物开发, 具有潜在的药用价值。

**【关键词】** 蝎毒素; 抗菌肽; 生物活性; 耐万古霉素肠球菌; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2024)02-0130-07

[*Journal of Pathogen Biology*. 2024 Feb;19(2):130-136.]

**Functional identification and bioinformatics analysis of antimicrobial peptide CeAP1 from scorpion venom**

Aorigele<sup>1,2</sup>, Huhezhuola<sup>1,2</sup>, Huyiligeqi<sup>1</sup>, ZENG Xianchun<sup>3</sup> (1. School of Mongolian Medicine, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028043, Inner Mongolia, China; 2. NMPA Key Laboratory of Quality Control of Traditional Chinese Medicine (Mongolian Medicine); 3. State key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology, China University of Geosciences)\*\*\*

**【Abstract】** **Objective** To obtain the cDNA coding for the antimicrobial peptide CeAP1 from scorpion venom and identify its biological activity. **Methods** In this study, we identified a novel short-chain antimicrobial peptide gene CeAP1 from the bark scorpion *Centruroides exilicauda* genome by bioinformatics analysis, its mature peptide is composed of 17 amino acid residues, and its secondary structure is  $\alpha$ -helix, is a natural cationic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptide (CaAMP). The structure analyses were conducted by using software and tools online. Then, the peptide were synthesized accordingly and its biological activities will be verified. **Results** Antimicrobial assay showed that CeAP1 is able to potently inhibit the growth of the tested *Staphylococcus aureus* and *Bacillus megaterium* with the minimal inhibitory concentration (MIC) values of 16.0  $\mu\text{mol/L}$  and 32.0  $\mu\text{mol/L}$ , respectively; especially that CeAP1 has bacteriostatic activity against clinically isolated multiple drug resistance Gram-positive bacteria, such as vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains with the MICs 16.0  $\mu\text{mol/L}$  and 32.0  $\mu\text{mol/L}$ , respectively, and has low hemolysis of human red blood cells. In addition, we found that at a concentration of 4 $\times$  MIC, CeAP1 completely killed all the cultured MRSA 16436 strain within 15 minutes. **Conclusion** CeAP1 has the activity against multi-drug resistant (MDR) bacteria and may be used for the treatment of MDR bacteria infection in drug development, which has potential medicinal value.

**【Key words】** scorpion toxin; AMPs; biological activity; VRE; MRSA

\* **【基金项目】** 国家药品监督管理局中药(蒙药)质量控制重点实验室开放基金项目(No. MDK2021072); 内蒙古民族大学博士科研启动基金项目(No. BS598); 内蒙古自治区自然科学基金资助项目(No. 2020LH08013); 内蒙古自治区自然科学基金资助项目(No. 2018LH08063)。

\*\* **【通讯作者(简介)】** 敖日格乐(1982-), 男(蒙古族), 内蒙古通辽人, 博士, 讲师。主要研究方向: 毒素多肽药物开发研究。  
E-mail: orgil@imun.edu.cn

人类过度滥用抗生素,易使病原微生物产生抗生素耐药性。近年来,大量病原微生物耐药及多重耐药(multidrug-resistant,MDR)菌引起的感染呈显著上升趋势。据估计,抗生素耐药菌引起的感染每年造成全世界70万人死亡,到2050年,多重耐药菌感染将导致全球1000万人死亡<sup>[1]</sup>。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)是一种人体皮肤和鼻腔黏膜的常见定植菌,同时也是临床常见的多重耐药菌,已成为全球院内感染的首要致病菌。目前,MRSA等多重耐药菌感染已成为严重威胁人类健康安全的全球性公共卫生问题,亟待开发出新型、高效且安全的抗菌药物,以缓解多重耐药菌的传播以及降低耐药菌感染导致的死亡。

抗菌肽(antimicrobial peptides,AMPs)作为生物体先天免疫系统的关键组成部分,是通常由10~100个氨基酸残基组成的一类阳离子型,具有 $\alpha$ -螺旋特征的两亲性无二硫键多肽分子,对细菌、真菌、病毒和寄生虫等病原微生物均具有抑制或杀伤作用<sup>[2]</sup>。天然抗菌肽还具有独特的抗菌机制、广谱的抗菌活性,且不易使病原菌产生耐受性等优点,是理想的新型抗菌剂,具有广阔应用前景。另外,抗菌肽具有序列短、结构简单、易于合成等特点,是开发新型抗菌药物的主要天然来源。Song等<sup>[3]</sup>研究发现,蝎毒素衍生肽GK-19具有很强的抗菌活性,与其母肽AamAP1(MIC值为 $>20.0\ \mu\text{mol/L}$ )相比,对革兰阴性细菌大肠埃希菌(*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)和绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的MIC值分别为 $3.0$ 、 $5.0$ 和 $5.0\ \mu\text{mol/L}$ ;对革兰阳性细菌粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)和MRSA的MIC值分别为 $3.0\ \mu\text{mol/L}$ 和 $5.0\ \mu\text{mol/L}$ 。GK-19对哺乳动物细胞几乎无毒性、溶血活性低,且在血浆中稳定性高。在MRSA诱导的小鼠皮肤烫伤模型中,GK-19显示出显著的抗菌和愈合作用。因此,抗菌肽的开发和应用研究已经成为该领域关注的热点和焦点<sup>[4]</sup>。本研究利用墨西哥雕像木蝎(*Centruroides exilicauda*)基因组数据,筛选得到1个新的短链抗菌肽基因序列,所编码的抗菌肽命名为CeAP1。为明确其生物活性,采用生物信息学工具对其结构信息及理化特征进行预测分析,结果报告如下。

## 材料与方 法

### 1 材料

**1.1 供试菌株** 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*),大肠埃希菌(*E. coli* DH5 $\alpha$ )及阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)购于中国典型培养物保藏中心;临床分离株

多重耐药菌VRE E156、VRE E161和MRSA 16436、MRSA 16559由北京朝阳医院提供。

**1.2 多肽** 多肽CeAP1的成熟肽序列(FFGLIPGLVGLISAFK)由上海波泰生物科技有限公司采用固相化学合成法合成,并对其C端进行酰胺化修饰。采用反相高效液相色谱法对合成的多肽CeAP1进行纯化,纯度达到 $\geq 96\%$ 。

### 2 方法

**2.1 多肽序列的获取及序列特征分析** 用BmKb1的多肽序列对*C. exilicauda*基因组数据进行tBlastx检索得到一个转录本序列,用ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)对该转录本进行序列分析获得可能的开放阅读框和所编码的多肽序列,用SignalP-5.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>)对获得的多肽序列进行信号肽预测,用DeepTMHMM(<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>)分析多肽的跨膜区,使用在线蛋白分析软件NPS@server(<http://npsa-pbil.ibcp.fr/>)和SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/>)对多肽二级结构预测和三维结构同源建模,用HeliQuesT(<http://heliquet.ipmc.cnrs.fr/>)绘制成熟肽序列螺旋轮图,并用ProtParam tool(<http://web.expasy.org/protparam/>)预测多肽分子量、理论等电点、总平均亲水性等理化性质。同时,运用Bioedit、MEGAX软件对成熟肽序列进行同源性比对和系统进化树分析;用WebLogo(<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>)对蝎源性短链抗菌肽序列保守性分析。

**2.2 圆二色光谱(circular dichroism spectra,CD)分析法测定多肽的二级结构** 试验在室温下进行,测试体系为 $200\ \mu\text{L}$ 的ddH<sub>2</sub>O和含有30%、70%三氟乙醇(TFE)的KP buffer,测定终浓度为 $100\ \mu\text{g/mL}$ 的多肽样品在 $190\sim 260\ \text{nm}$ 波长范围内的圆二色谱,从而得到多肽分子的二级结构。

**2.3 体外溶血活性测定** 采用Sinha等<sup>[5]</sup>的方法进行溶血试验。采集人新鲜红细胞,用0.85% NaCl溶液重悬后 $1000\ \text{g}$ 离心 $5\ \text{min}$ 。重复以上操作直到红细胞悬浮液的吸光度A值与0.85% NaCl溶液的A值相同。然后用0.85% NaCl溶液稀释红细胞悬浮液至浓度为 $1\times 10^7\sim 10^8\ \text{CFU/mL}$ 。实验组(A<sub>treatment</sub>)为含有不同浓度梯度多肽的红细胞悬浮液,空白组(A<sub>blank</sub>)只有红细胞悬浮液,100%裂解组(A<sub>trition</sub>)加入1% Triton X-100的红细胞悬浮液,全部样品置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 条件下培养 $30\ \text{min}$ , $10000\ \text{g}$ 离心 $2\ \text{min}$ ,取上清,测定A<sub>570</sub>值,按以下公式计算多肽对红细胞的裂解率(%)。红细胞的裂解率(%) =  $(A_{\text{treatment}} - A_{\text{blank}}) /$

$$(A_{\text{Triton}} - A_{\text{blank}}) \times 100\%$$

**2.4 最低(小)抑菌质量浓度测定** 根据 Xu 等<sup>[6]</sup>的实验方案,采用微量倍比稀释法定量测定肽的最低抑菌浓度(MIC)值。将培养至对数生长期细菌细胞用新鲜 LB 培养基重悬为  $10^5 \sim 10^6$  CFU/mL 的菌悬液。采用微量倍比稀释法将多肽梯度稀释成终浓度为 64.0 至 2.0  $\mu\text{mol/L}$  的 100  $\mu\text{L}$  系列磷酸盐缓冲液,然后加入到 96 孔酶标板中,再加入等体积的以上菌悬液,于 37  $^\circ\text{C}$  摇床以 150 r/min 振荡培养 18 h,用酶标仪测定  $A_{630}$  值,计算多肽对不同菌株的 MIC 值。

**2.5 多肽时间-杀菌曲线测定** 根据 Yuen 等<sup>[7]</sup>的方法进行试验。将受试菌 MRSA 16436 接种于 LB 培养基中于 37  $^\circ\text{C}$  条件下以 150 r/min 振荡培养至对数生长期(细胞密度为  $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  CFU/mL)。在装有细菌的试管中分别加入多肽溶液至终浓度为  $1 \times, 2 \times, 4 \times \text{MIC}$ ,混均后继续培养。在不同时间点(0、5、15、30 和 60 min),从每个试管中取出 100  $\mu\text{L}$  菌悬液,1 000 g 离心 5 min,弃掉上清,用 100  $\mu\text{L}$  LB 培养基重悬沉淀,梯度稀释后涂布于 LB 固体平板,37  $^\circ\text{C}$  培养 12~18 h,计数每个平板上的单菌落数。以多肽作用时间为横坐标,以不同时间点细菌计数的对数为纵坐标绘制时间-菌落数对数曲线。试验以  $1 \times \text{MIC}$  头孢噻肟处理的细菌作为阳性对照。

**2.6 肽与 DNA 结合试验** 参照骆雪月<sup>[8]</sup>的方法稍做修改。用凝胶阻滞试验对肽与 DNA 的结合进行定性和定量分析。若肽与 DNA 相结合,则 DNA 在电场中的迁移就会受到阻滞。将 250 ng 的 *S. aureus* 基因组 DNA 与不同浓度的多肽(0.2、0.5、1.0 和 2.0  $\mu\text{mol/L}$ )在室温下孵育 10 min,结合体系为 10  $\mu\text{L}$ 。加入 2  $\mu\text{L}$  的上样缓冲液后,用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 迁移情况。用凝胶成像仪观察凝胶阻滞情况,并拍照记录结果。试验以牛血清白蛋白(BSA)处理后的 *S. aureus* 基因组 DNA 作为阳性对照。

## 结果

### 1 CeAP1 的生物信息学分析

**1.1 CeAP1 基因核苷酸序列分析** 用 BmKb1 前体序列为检索序列,对 *C. exilicauda* 转录本进行 tblastn 检索获得一条与 BmKb1 较高序列同源性的 cDNA 序列 CSCU008282(图 1),其长度由 690 个核苷酸组成,包含一段长度为 225 bp 的开放阅读框、5' 端有一段长度为 379 bp 的非编码区(5' UTR)和 3' 端有一段长度为 86 bp 的非编码区(3' UTR),多聚腺苷酸化信号(AATAAA)位于终止密码子下游 78 bp 处。

```
>CeAP1_C_exilicauda
5'-AATCTTACTGTTTGAATTGTATCGTAGTTTATAAATAATTTATAAAGCTAGTACATAA
GACGTTACCATAGACGTTTATGTTTACGATGAAAACTAGTAAAAGGCCCAATTTCTGTCTAAGGGCCGAA
AAGGCTTAATCCGCCACTGGTAATGGCCCTTGGAGCCACTAAAAACACTAAATCATTTTCAATTCGTTCAAGTAA
AATAAAATATAGTCTATAGATTGTTTAACTCAATATTAATAAAAAATGGAAAAACAATAAATAATTCGATTT
CTAAGTTTTAAAGGCTAAATAATAAAAAATGAATATATATATCTTTTTTTAGATCCGGAAAGCTCCCAATTCACA
-22 -20 -15 -10 -5 -1 +1
AG ATG CAA ATA AAA CAT CTT ATT GTT GTC TTC TTT GTC GTT TIG ATC GAA GAA TTC AGA GAA TTT TTT GTC
M Q I K H L I V V F F V L L V A D H C H A E
+5 +10 +15 +20
TTT GGC TTA ATT CCT GGT TTG GTA GGT AGT CTT ATT TCT GCA TTT AAG GGT AGA AGG AAA CGA GAC TTG
F G L I P G L V G S L I S A F K G R R K R D L
+25 +30 +35 +40 +45
ACC GCA CAA TTG AAC CAA TAT AGA CAT CTG CAG AAA CGT GAG GCA GAA GAA TTC AGA GAA TTT TTT GTC
T A Q I N Q Y R H I Q K R F A F E F K R F F L D
+50 +52
AAT CTG CCG ATT TAT TAA CTTGATTTAAAGCACTGAAATATAATAATAATAGGACTGCTACTTTGAAATGAACACT
N L P I end
GTATTTTATTTTAAACAAATAACA poly(A) 3'
```

图 1 多肽 CeAP1 cDNA 序列及其编码蛋白的氨基酸序列  
Fig. 1 Nucleotide sequence of the cDNA encoding the precursor of CeAP1

**1.2 CeAP1 氨基酸序列分析** CeAP1 的 cDNA 序列开放阅读框编码长度为 74 个氨基酸残基的前体肽(图 1)。CeAP1 前体肽序列包含信号肽(图 1 下划线标识)、成熟肽(图 1 加粗标出)和前肽(图 1 浅蓝色标记)序列,分别由 22、17 和 35 个氨基酸残基组成。在 CeAP1 的成熟肽序列 C 末端具有典型的翻译后修饰信号(GRR),其中 G 是肽基甘氨酸  $\alpha$ -酰胺化单加氧酶识别信号,RR 是羧肽酶切割信号,说明 CeAP1 的成熟肽 C 末端会被酰胺化。

预测 CeAP1 前体肽序列具有信号肽,且信号肽的切割位点位于第 22 和 23 号氨基酸之间(图 2),属于一种典型的分泌性蛋白。预测 CeAP1 多肽链不含跨膜区域(图 3),且该多肽属于膜外蛋白。利用 SWISS-MODEL 在线同源建模软件预测 CeAP1 的三维结构,结果如图 4B,C,其结构中  $\alpha$ -螺旋数量较多,与其二级结构预测结果(图 4A)一致。

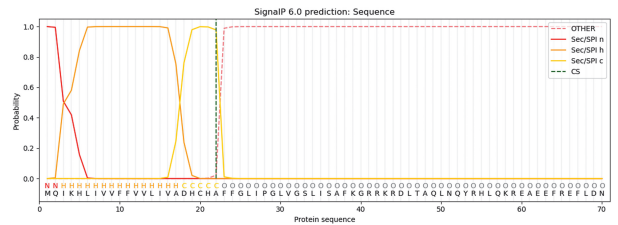


图 2 CeAP1 前体肽序列信号肽预测  
Fig. 2 Prediction of signal peptide of CeAP1

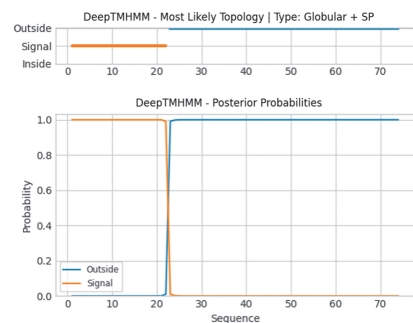
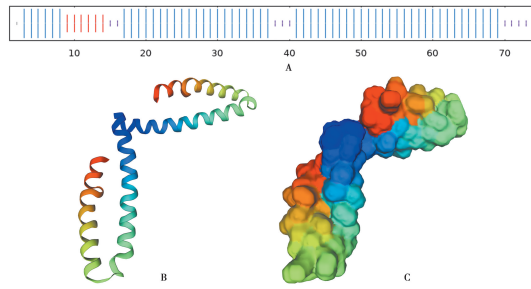


图 3 CeAP1 的跨膜结构域预测  
Fig. 3 Prediction of transmembrane region of CeAP1



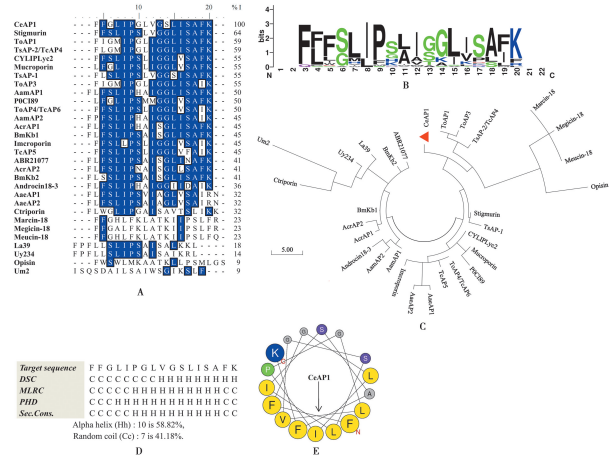
A 二级结构 B Cartoon 结构 C Surface 结构  
图 4 CeAP1 前体肽的二级结构和三维结构预测

A Secondary structure B Cartoon structure C Surface structure  
Fig. 4 3D structure and secondary structure of precursor of CeAP1

**1.3 CeAP1 成熟肽理化性质** CeAP1(序列: FFG LIPGLVGLSLISAFK-N H2)是由 17 个氨基酸残基组成的阳离子多肽。在 pH 值为 7 的条件下的电荷为 +2, 其中一个正电荷由酰胺化的 C 末端提供, 另一个正电荷由多肽的碱性氨基酸赖氨酸 (K) 提供。ProtParam 预测 CeAP1 的分子质量预测值和实测值分别为 1 766. 16 ku 和 1 765. 19 ku, 等电点为 8. 75, 表明该多肽为碱性多肽; 不稳定系数为 -6. 12, 总平均亲水性值(Grand average of hydropathicity, GRAVY) 为 1. 56, 疏水矩为 0. 568  $\mu$ H, 为稳定的疏水性蛋白。

在 NCBI 和抗菌肽数据库 APD3 中, 以 CeAP1 多肽序列为模板共检索到 29 条蝎毒素多肽序列, 其成熟肽序列长度均为 17~19 个氨基酸残基, 属于短链阳离子抗菌肽。对其成熟肽序列同源性进行比对, 结果如图 5A。从 *C. exilicauda* 分离的 CeAP1 与 Stigmurin (来源于 *Tityus stigmurus*)<sup>[9]</sup>、ToAP1 (*Tityus obscurus*)<sup>[10]</sup>、TsAP-2/TcAP4 (*Tityus serrulatus/Tityus costatus*)<sup>[11-12]</sup>、CYLIPL-yc-2 (*Lychas buchari*)<sup>[13]</sup>、Mucroporin (*Lychas mucronatus*)<sup>[14]</sup>、TsAP-1(*T. serrulatus*)<sup>[11]</sup>、ToAP3(*T. obscurus*)<sup>[10]</sup>、AamAP1 (*Androctonus amoreuxi*)<sup>[15]</sup>、POCI89 (*L. mucronatus*)<sup>[16]</sup> 和 ToAP4/TcAP6 (*T. obscurus/T. costatus*)<sup>[10,12]</sup> 之间的同源性为 64. 0%~50. 0%。CeAP1 与 AamAP2 (来源于 *A. amoreuxi*)<sup>[15]</sup>、AcrAP1 (*Androctonus crassicauda*)<sup>[17]</sup>、BmKb1 (*Mesobuthus martensii*)<sup>[18]</sup>、Imcroporin (*Isometrus maculatus*)<sup>[19]</sup>、TcAP5 (*T. costatus*)<sup>[12]</sup>、ABR21077 (*Mesobuthus eupeus*)<sup>[20]</sup>、AcrAP2 (*A. crassicauda*)<sup>[17]</sup>、BmKb2 (*M. martensii*)<sup>[21]</sup>、Androcin18-3 (*Androctonus bicolor*)<sup>[22]</sup>、AaeAP1 (*Androctonus aeneas*)<sup>[23]</sup>、AaeAP2 (*A. aeneas*)<sup>[23]</sup>、Ctriporin (*Chaerilus tricostatus*)<sup>[24]</sup>、Megicin-18 (*Mesobuthus gibbosus*)<sup>[25]</sup>、Meucin-18 (*M. eupeus*)<sup>[26]</sup>、Marcin-18 (*M. martensii*)<sup>[27]</sup>、La39 (*Liocheles australasiae*)<sup>[28]</sup>、Uy234 (*Urodacus*

*yaschenkoi*)<sup>[29]</sup>、Opisin (*Opisththalmus glabrifrons*)<sup>[30]</sup> 和 Um2 (*U. manicatus*)<sup>[29]</sup> 之间有 45. 0%~9. 0% 的同源性。由此可知, CeAP1 是从 *C. exilicauda* 的 cDNA 文库中筛选出的一个新的短链阳离子多肽, 推测具有抗菌活性。序列保守性分析(图 5B)显示, 这些抗菌肽的成熟肽序列具有极高的相似度, 有连续高度保守的氨基酸位点。系统进化树分析(图 5C)显示, 这些抗菌肽的亲缘关系与序列同源比对结果高度一致。



A 序列同源性比对 B 序列保守性分析 C 系统进化树 D 二级结构 E 螺旋轮图

图 5 CeAP1 的生物信息学分析

A Homologous sequence alignment B Sequence conservation analysis C Phylogenetic tree D Secondary structure E Helical wheel diagram

Fig. 5 Bioinformatics analysis of CeAP1

二级结构预测(图 5D)显示, CeAP1 成熟肽主要为  $\alpha$ -螺旋结构, 占 58. 82%; 其余为无规则卷曲, 占 41. 18%。螺旋轮图预测(图 5E)显示, CeAP1 的分子结构具有典型的两亲分子特征, 其亲水性氨基酸和疏水性氨基酸有规律地排列在  $\alpha$ -螺旋的两侧, 并形成亲水区域和疏水区域。这与其他蝎源性抗菌肽结构特征一致, 表明 CeAP1 在细胞膜的疏水环境中可形成两亲性  $\alpha$ -螺旋结构。

## 2 圆二色光谱法测定 CeAP1 的二级结构

采用圆二色光谱法来测定多肽在液体环境中的二级结构, 即以 ddH<sub>2</sub>O 模拟体内的良性水环境, 以 30% 和 70% 的 TFE 溶液模拟细胞膜疏水环境, 观察 CeAP1 在不同液体环境中的二级结构。在水相环境下, 多肽 CeAP1 几乎无螺旋结构; 在疏水环境(30% TFE 和 70% TFE)中, 多肽 CeAP1 在 208 nm 和 222 nm 波长处均出现明显的负峰(图 6), 这正是多肽  $\alpha$ -螺旋二级结构的典型特征, 说明 CeAP1 在疏水环境中可被诱导为  $\alpha$ -螺旋结构, 意味着 CeAP1 分子在进入细胞膜的疏水环境中时也将被诱导为  $\alpha$ -螺旋结构。

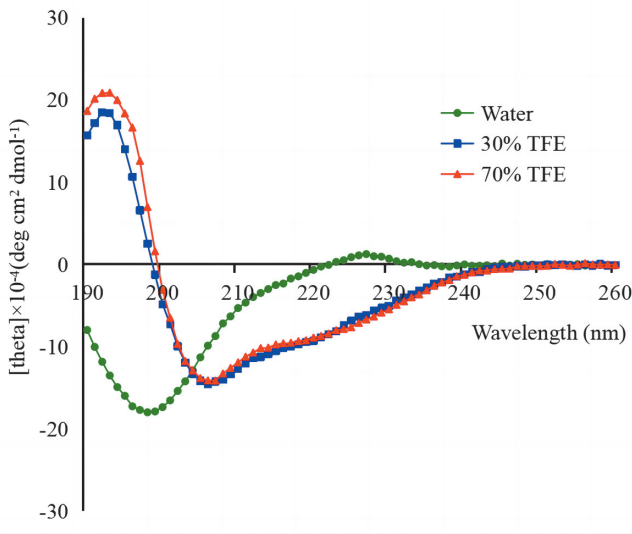


图 6 圆二色光谱法测定 CeAPI 的二级结构  
Fig. 6 CD spectra of the peptide CeAPI

### 3 CeAPI 的溶血活性

溶血活性测定结果(图 7)显示, CeAPI 浓度范围为 16.0~32.0  $\mu\text{mol/L}$  时, 对人红细胞的裂解率为 0.42%~13.12%, 表现出较弱的溶血活性。根据裂解曲线, CeAPI 对人红细胞的血清半数溶血值(Hc50)为 52.0  $\mu\text{mol/L}$ 。表明 CeAPI 的溶血活性适中。

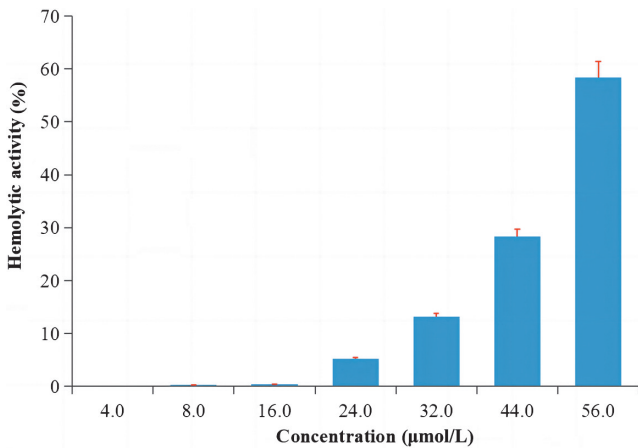


图 7 CeAPI 的溶血活性  
Fig. 7 The hemolytic activity of CeAPI *in vitro*

### 4 CeAPI 抗菌活性

MICs 结果(表 1)显示, CeAPI 对革兰阳性菌 *S. aureus* 和 *B. megaterium* 的 MIC 值分别为 16.0  $\mu\text{mol/L}$  和 32.0  $\mu\text{mol/L}$ ; 对革兰阴性菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  和 *E. cloacae* 无明显抑制活性, 在浓度为 32.0  $\mu\text{mol/L}$  条件下, 细菌均能正常生长。CeAPI 对临床分离的多重耐药性革兰阳性菌株均表现出较强的抑菌活性, 其中对 VRE E156 和 VRE E161 菌株的 MIC 值均为 16.0  $\mu\text{mol/L}$ , 对 MRSA16436 和 MRSA16559 菌株的 MIC 值均为 32.0  $\mu\text{mol/L}$ , 略低于对耐万古霉素肠球

菌的抗菌活性。

表 1 CeAPI 的抗菌活性  
Table 1 Antimicrobial activity of CeAPI

病原微生物 Pathogenic Microbes	MIC ( $\mu\text{mol/L}$ )
Gram-positive bacteria	
<i>S. aureus</i> AB 94004	16.0
<i>B. megaterium</i> AB 90008	32.0
Gram-negative bacteria	
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	>32.0
<i>E. cloacae</i> AB 2010162	>32.0
Multidrug-resistant bacteria	
MRSA 16436CCTCC AB 2015107	32.0
MRSA 16559CCTCC AB 2015110	32.0
VRE E156CCTCC AB 2015103	16.0
VRE E161CCTCC AB 2015104	16.0

### 5 CeAPI 与 DNA 结合试验

CeAPI 与 *S. aureus* 基因组 DNA 结合试验结果(图 8)显示, 当浓度为  $\geq 1.0 \mu\text{mol/L}$  时, CeAPI 与 DNA 结合紧密, 使得 DNA 阻滞在点样孔处, 电场中无法向正极移动; 而牛血清白蛋白的浓度为 2.0  $\mu\text{mol/L}$  时也不与 *S. aureus* 基因组 DNA 结合。由此可见, CeAPI 能够穿过细胞膜进入细胞内部后与细菌基因组 DNA 和 RNA 相结合, 抑制蛋白质合成, 导致细菌细胞死亡。

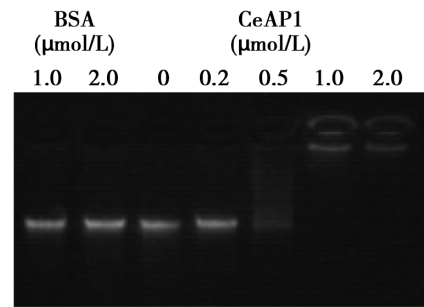


图 8 CeAPI 与 *S. aureus* 基因组 DNA 结合试验  
Fig. 8 Gel retardation assays of CeAPI binding *S. aureus* genomic DNA

### 6 CeAPI 杀菌活性

测定 CeAPI 对 MRSA 16436 菌株的时间-杀菌曲线, 评价其快速杀菌能力。结果(图 9)显示, 随着多肽 CeAPI 浓度的增加, 其杀菌活性明显增加。当用  $1 \times \text{MIC}$  浓度的多肽 CeAPI 处理 MRSA 16436 时, 在 5 min 内快速杀死细菌, 细菌存活率降低至 6.80%; 用  $4 \times \text{MIC}$  浓度的多肽 CeAPI 处理 MRSA 16436, 在 15 min 内细菌的存活率迅速下降为零。相比之下, 阴性对照组细菌数目在 5 min 后仍然继续增加,  $1 \times \text{MIC}$  浓度的头孢噻肟处理组细菌数目几乎保持平稳状态。

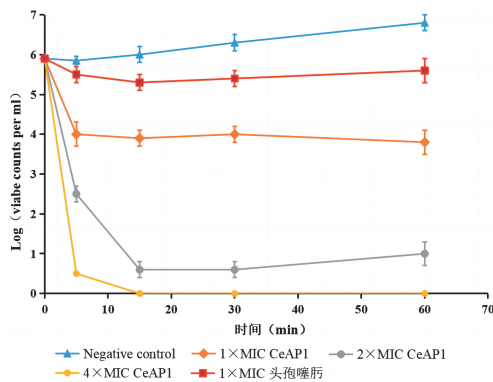


图9 CeAP1对MRSA 16436菌株的时间-杀菌曲线  
Fig. 9 Time-kill curves (TKC) of CeAP1 against MRSA 16436

## 讨论

借助生物信息学手段,从 *C. exilicauda* 基因组数据中筛选得到一条新的抗菌肽基因 CeAP1,其编码多肽成熟肽由 17 个氨基酸残基组成,净电荷为 +2,是一个典型的阳离子抗菌肽。此类抗菌肽因本身携带足量的正电荷并常伴随疏水性,所以能够与带负电荷的细菌细胞膜相互作用,改变细胞膜的通透性,导致细菌细胞膜的裂解和细胞内容物泄露<sup>[31]</sup>。CeAP1 二级结构呈现为典型的  $\alpha$ -螺旋结构,其亲水性氨基酸和疏水性氨基酸有规律地排列在  $\alpha$ -螺旋的两侧,分别形成亲水性区域和疏水性区域。在 CeAP1 穿透细胞膜磷脂双分子层的过程中,其疏水区域靠近磷脂膜上疏水区域,而其亲水区域向内,这有利于插入细胞膜内部,从而破坏细胞膜结构<sup>[32]</sup>。肽与 DNA 结合试验结果表明,CeAP1 能够穿过细菌细胞膜进入细胞内部后与 *S. aureus* 基因组 DNA 及 RNA 相结合,进而抑制细菌蛋白质合成,导致细菌细胞死亡。

根据蝎无二硫键多肽(non-disulfide-bridged peptides, NDBPs)结构特点,将蝎毒素来源的抗菌肽大致可分为 3 类<sup>[33]</sup>。第一类,具有 100% 的螺旋结构的 NDBPs;第二类,具有两个  $\alpha$ -螺旋结构的 NDBPs;第三类,具有一个  $\alpha$ -螺旋结构,C 末端和 N 末端为无规则卷曲的 NDBPs。本研究获得的抗菌肽 CeAP1 无二硫键,具有一个  $\alpha$ -螺旋结构,C 末端和 N 末端为无规则卷曲,归于第三类别,属于短链无二硫键抗菌肽家族。

通过 blastP 数据库检索得到的 29 条抗菌肽序列中,大多数(除 Ctriporin、La39、Uy234、Opisin 和 Um2 以外)均来自于钳蝎科蝎种。多序列比对分析显示,CeAP1 与同源蝎(钳蝎)科来源的抗菌肽之间有 64.0%~23.0% 的序列同源性,而非同源蝎科抗菌肽 Ctriporin、La39、Uy234、Opisin 和 Um2 之间的序列同源性分别为 32.0%、18.0%、14.0%、9.0% 和 9.0%。系统进化树也进一步反映了各物种或基因间

在进化上的亲缘关系。

MICs 测定结果表明,CeAP1 具有较强的抗菌能力,对革兰阳性菌 *S. aureus* 和 *B. megaterium* 的 MIC 值分别为 16.0  $\mu\text{mol/L}$  和 32.0  $\mu\text{mol/L}$ ;对革兰阴性菌无明显抑制活性,在浓度为 32.0  $\mu\text{mol/L}$  时,*E. coli* DH5 $\alpha$  和 *E. cloacae* 均能正常生长。这种差异可能与两种细菌细胞壁的构造和化学组成不同有关。值得注意的是,CeAP1 对临床分离到的 MRSA 和 VRE 菌株均有抑菌活性,其中对 VRE E156 和 VRE E161 菌株的 MIC 值均为 16.0  $\mu\text{mol/L}$ ,而对 MRSA16436 和 MRSA16559 菌株的 MIC 值均为 32.0  $\mu\text{mol/L}$ ,略低于对耐万古霉素肠球菌的抗菌活性。溶血试验结果表明,CeAP1 对人的红细胞有较低的溶血活性,其 Hc50 值为 52.0  $\mu\text{mol/L}$ 。以上表明 CeAP1 可能适合于治疗多重耐药菌引起的感染,具有潜在的药用价值。

在抗菌肽数据库中,70 种抗菌肽已经进入药物开发渠道,其中 27 种处于临床试验阶段。到目前为止,已有 8 种抗菌药物获得美国食品药品监督管理局(FDA)批准,包括达托霉素、多黏菌素 B、恩福韦肽、杆菌肽、格列美汀、黏菌素、特拉普韦和万古霉素<sup>[34]</sup>。尽管抗菌肽应用前景广阔,但对于抗菌肽的免疫原性、毒性、药动学及药效学的研究还较为有限,抗菌肽的临床试验仍局限于局部治疗,对于抗菌肽的基础与临床应用研究有待进一步深入。最理想的抗菌肽药物应该具有高抗菌活性、低毒性或无毒性的特性。以天然抗菌肽为模板,设计出高抗菌活性、低毒高效的新型抗菌肽,是解决抗菌肽抗菌活性弱、溶血性高的最有效方式之一。

## 【参考文献】

- [1] Ratia C, Soengas RG, Soto SM. Gold-derived molecules as new antimicrobial agents [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 846959-846968.
- [2] Rincon-Cortes CA, Bayona-Rojas MA, Reyes-Montano EA, et al. Antimicrobial activity developed by scorpion venoms and its peptide component [J]. *Toxins (Basel)*, 2022, 14(11): 740.
- [3] Song C, Wen R, Zhou J, et al. Antibacterial and antifungal properties of a novel antimicrobial peptide GK-19 and its application in skin and soft tissue infections induced by MRSA or *Candida albicans* [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(9): 1937.
- [4] Mangmee S, Reamtong O, Kalambaheti T, et al. Antimicrobial peptide modifications against clinically isolated antibiotic-resistant *Salmonella* [J]. *Molecules*, 2021, 26(15): 4654-4668.
- [5] Sinha S, Batovska DI, Medhi B, et al. *In vitro* anti-malarial efficacy of chalcones: cytotoxicity profile, mechanism of action and their effect on erythrocytes [J]. *Malar J*, 2019, 18(1): 421.
- [6] Xu N, Du LH, Chen YC, et al. *Lonicera japonica* Thunb. as a promising antibacterial agent for *Bacillus cereus* ATCC14579 based on network pharmacology, metabolomics, and *in vitro* experiments [J]. *RSC Adv*, 2023, 13(23): 15379-15390.

- [7] Yuen HL, Chan SY, Ding YE, et al. Development of a novel antibacterial peptide, PAM-5, via combination of phage display selection and computer-assisted modification[J]. *Biomolecules*, 2023,13(3):466.
- [8] 骆雪月. 抗菌肽 W3R6 对于耻垢分枝杆菌的抗菌活性及其作用机制的研究[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2020.
- [9] De Melo ET, Estrela AB, Santos EC, et al. Structural characterization of a novel peptide with antimicrobial activity from the venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus*; Stigmurin[J]. *Peptides*, 2015, 68:3-10.
- [10] Guilhelmelli F, Vilela N, Smidt KS, et al. Activity of scorpion venom-derived antifungal peptides against planktonic cells of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* biofilms[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7:1844-1857.
- [11] Guo X, Ma C, Du Q, et al. Two peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the venom of the Brazilian yellow scorpion, *Tityus serrulatus*: evaluation of their antimicrobial and anticancer activities[J]. *Biochimie*, 2013, 95(9):1784-1794.
- [12] Diego-Garcia E, Batista CV, Garcia-Gomez BI, et al. The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and function[J]. *Toxicon*, 2005, 45(3):273-283.
- [13] Sunagar K, Undheim EA, Chan AH, et al. Evolution stings: the origin and diversification of scorpion toxin peptide scaffolds[J]. *Toxins (Basel)*, 2013, 5(12):2456-2487.
- [14] Dai C, Ma Y, Zhao Z, et al. Mucroporin, the first cationic host defense peptide from the venom of *Lychas mucronatus* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(11):3967-3972.
- [15] Almaaytah A, Zhou M, Wang L, et al. Antimicrobial/cytolytic peptides from the venom of the North African scorpion, *Androctonus amoreuxi*: biochemical and functional characterization of natural peptides and a single site-substituted analog[J]. *Peptides*, 2012, 35(2):291-299.
- [16] Zhao RM, Ma YB, He YW, et al. Comparative venom gland transcriptome analysis of the scorpion *Lychas mucronatus* reveals intraspecific toxic gene diversity and new venomous components[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11:452-466.
- [17] Du Q, Hou X, Ge L, et al. Cationicity-enhanced analogues of the antimicrobial peptides, AcrAP1 and AcrAP2, from the venom of the scorpion, *Androctonus crassicauda*, display potent growth modulation effects on human cancer cell lines[J]. *Int J Biol Sci*, 2014, 10(10):1097-1107.
- [18] Zeng XC, Wang SX, Zhu Y, et al. Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsch [J]. *Peptides*, 2004, 25(2):143-150.
- [19] Zhao Z, Ma Y, Dai C, et al. Imcroporin, a new cationic antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Isometrus maculatus* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(8):3472-3477.
- [20] Gao B, Xu J, Rodriguez Mdel C, et al. Characterization of two linear cationic antimalarial peptides in the scorpion *Mesobuthus eupeus* [J]. *Biochimie*, 2010, 92(4):350-359.
- [21] Luo F, Zeng X C, Hahin R, et al. Genomic organization of four novel nondisulfide-bridged peptides from scorpion *Mesobuthus martensii* Karsch: gaining insight into evolutionary mechanism [J]. *Peptides*, 2005, 26(12):2427-2433.
- [22] Zhang L, Shi W, Zeng XC, et al. Unique diversity of the venom peptides from the scorpion *Androctonus bicolor* revealed by transcriptomic and proteomic analysis [J]. *J Proteomics*, 2015, 128:231-250.
- [23] Du Q, Hou X, Wang L, et al. AaeAP1 and AaeAP2: novel antimicrobial peptides from the venom of the scorpion, *Androctonus aeneas*: structural characterisation, molecular cloning of biosynthetic precursor-encoding cDNAs and engineering of analogues with enhanced antimicrobial and anticancer activities [J]. *Toxins (Basel)*, 2015, 7(2):219-237.
- [24] Fan Z, Cao L, He Y, et al. Ctriporin, a new anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* peptide from the venom of the scorpion *Chaerilus tricostatus* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(11):5220-5229.
- [25] Diego-Garcia E, Caliskan F, Tytgat J. The Mediterranean scorpion *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones, Buthidae): transcriptome analysis and organization of the genome encoding chlorotoxin-like peptides [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1):295-310.
- [26] Gao B, Sherman P, Luo L, et al. Structural and functional characterization of two genetically related meucin peptides highlights evolutionary divergence and convergence in antimicrobial peptides [J]. *FASEB J*, 2009, 23(4):1230-1245.
- [27] Liu G, Yang F, Li F, et al. Therapeutic potential of a scorpion venom-derived antimicrobial peptide and its homologs against antibiotic-resistant Gram-positive bacteria [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9:1159-1172.
- [28] 朱晨刚, 贾庭. 蝎毒素抗菌肽 La39 的序列分析及功能鉴定 [J]. *生物学杂志*, 2022, 39(1):33-36.
- [29] Luna-Ramirez K, Tonk M, Rahnamaeian M, et al. Bioactivity of natural and engineered antimicrobial peptides from venom of the scorpions *Urodacus yaschenkoi* and *U. manicatus* [J]. *Toxins (Basel)*, 2017, 9(1):22-33.
- [30] Bao A, Zhong J, Zeng XC, et al. A novel cysteine-free venom peptide with strong antimicrobial activity against antibiotics-resistant pathogens from the scorpion *Opisthophthalmus glabrifrons* [J]. *J Pept Sci*, 2015, 21(10):758-764.
- [31] Zhang QY, Yan ZB, Meng YM, et al. Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential [J]. *Mil Med Res*, 2021, 8(1):48-72.
- [32] Li T, Li L, Du F, et al. Activity and mechanism of action of antifungal peptides from microorganisms: a review [J]. *Molecules*, 2021, 26(11):3438.
- [33] Almaaytah A, Albalas Q. Scorpion venom peptides with no disulfide bridges; a review [J]. *Peptides*, 2014, 51:35-45.
- [34] 周舒文, 王程, 邱琳, 等. 面向临床应用的抗菌肽: 递送和剂型 [J]. *科学通报*, 2021, 66(26):3365-3366.

【收稿日期】 2023-07-25 【修回日期】 2023-10-10