

抗菌肽的提取分离及抑菌机理研究进展

苗建银^{1,2}, 柯畅¹, 郭浩贤¹, 刘果¹, 高向阳¹, 曹庸¹

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 钦州学院 海洋学院, 广西钦州 535000)

摘要: 传统杀菌剂和抗生素的长期大量使用不但导致部分病原微生物和环境害虫产生耐药性, 同时也存在着严重的环境和健康风险。因此继续寻找和开发不易产生耐药性的新型抗菌物质显得非常迫切, 也具有重要意义, 天然抗菌肽是一类小分子阳离子肽, 是机体天然防御系统的重要组成部分。它们具有较宽的抗菌活性和不同于传统抗生素的作用机制。部分抗菌肽对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌、真菌、寄生虫、包膜病毒和癌细胞均不同程度的抑制和杀伤作用。抗菌肽在抑制病原微生物方面的特性使其有望成为传统杀菌剂和抗生素的替代物, 在医疗工业和食品添加剂行业具有很好的应用前景。抗菌肽的分离纯化本文对抗菌肽研究进行了概述, 其中重点分析了抗菌肽在提取分离及抑菌机理领域的研究进展。

关键词: 抗菌肽; 研究进展; 提取分离; 抑菌机理

文章编号: 1673-9078(2014)1-233-240

Extraction, Isolation and Antibacterial Mechanism of Antibacterial Peptides

MIAO Jian-yin^{1,2}, KE Chang¹, GUO Hao-xian¹, LIU Guo¹, GAO Xiang-yang¹, CAO Yong¹

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Ocean College, Qinzhou University, Qinzhou 535000, China)

Abstract: Long-term use of antiseptic and antibiotics has led to the development of resistance among pathogens and other pests as well as the increase of environmental and health risks. Thus, there is a significant and urgent need to find new antibiotics which hardly to induce resistance. Natural antimicrobial peptides, which are the critical component of the natural defense system, are kinds of small cationic peptides with broad antimicrobial activity, and possess a different mode of action compared to traditional antibiotics. Several antimicrobial peptides can inhibit and kill Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungi, parasite, enveloped virus and cancer cells. Antimicrobial peptides are considered as new substitutes for conventional antimicrobials and antibiotics because of their efficiency in fighting against pathogens, and have a very good application prospect in pharmaceuticals and food additive industries. In this paper, we reviewed the research progress of antimicrobial peptides, and emphatically analyzed the extraction, isolation of the peptides and their antibacterial mechanism.

Key words: antimicrobial peptides; research progress; extraction and isolation; antibacterial mechanism

在医疗保健行业, 抗生素的耐药性已对公众健康造成重大危害^[1], 而在现代食品工业以及种植、养殖业中, 化学防腐剂、杀虫剂及抗生素的不规范使用及残留隐患已越来越引起消费者关注, 人们更倾向于消费天然来源的食品资源。因此, 开发不易产生耐药性且无残留隐患的新型抗菌物质具有重要的现实意义, 而作为天然来源的抗菌肽有望成为急需的替代品。

抗菌肽又称抗微生物肽 (antimicrobial peptides) 或肽抗生素 (peptide antibiotics), 来源于微生物的抗菌

收稿日期: 2013-07-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31171768)

作者简介: 苗建银 (1981-), 男, 讲师, 研究方向: 食品质量与安全

通讯作者: 曹庸 (1966-), 男, 教授, 博导, 研究方向: 天然产物与功能性食品开发

肽又称细菌素^[2], 是机体先天防御系统的重要组成部分。自上世纪七十年代, 瑞典科学家Boman^[3]研究小组从惜古比天蚕(Hyatophoya cecropia)中发现第一种抗菌肽天蚕素Cecropins以来, 每年都有大量新的抗菌肽被发现。目前发现的多数抗菌肽具有较宽的活性谱, 可有效杀死细菌、真菌、寄生虫甚至包膜病毒^[4-5], 更为重要的是, 抗菌肽可以有效抑制对抗生素产生耐药性的细菌^[6], 因此抗菌肽又被誉为“天然超级抗生素”。同时, 抗菌肽还具有杀菌速度快、不易被蛋白酶水解等特点^[7]。

从来源广泛、成分复杂的原料中分离纯化抗菌肽是抗菌肽研究中的关键环节, 因为足够量的抗菌肽单体是进一步对抗菌肽进行结构分析、理化特性分析和作用机理深入研究的前提^[8]。然而, 目前关于抗菌肽的

报道中,部分研究仍然是以混合物的形式进行^[9]。因此,研究合理的分离纯化手段分离抗菌肽与发现新的抗菌肽来源同样重要。

由于抗菌肽不是一类均一的物质,使其抑菌机制不同于传统抗生素且不易产生耐药性,关于抗菌肽抑菌机理的研究成为近年来研究的热点。目前已报道的研究抗菌肽作用机制的技术手段有多种,且提出了抗菌肽对靶细胞膜的攻击作用模型及细胞内大分子代谢抑制等抑菌机理理论。伴随着越来越多新的抗菌肽资源被发现,深入研究其作用机理有助于抗菌肽快速投入实际应用。

本文对抗菌肽进行了综述,其中重点分析了抗菌肽在分离鉴定及抑菌作用机理领域的研究进展,将为抗菌肽的研究和应用提供一些详细的资料。

1 抗菌肽概述

抗菌肽是生物机体产生的一种自我防御的小分子多肽,根据来源不同分为植物源抗菌肽^[10]、动物中的无脊椎动物抗菌肽和脊椎动物源抗菌肽^[11]、微生物源抗菌肽^[12]等。抗菌肽肽链相对较短,一般少于60个氨基酸残基,其中具有代表性的抗菌肽氨基酸残基多为12~50个。抗菌肽一般带有2~9个正电荷(多数4~6个正电荷),带正电荷的多少取决于肽链中赖氨酸、精氨酸和组氨酸残基含量^[13]。一般认为这些阳离子肽倾向于同表面或细胞膜带负电荷的菌体磷脂双分子层作用^[14]。此外,它们通常拥有约50%的疏水残基,因此,这些抗菌肽在空间结构上存在疏水区和亲水区,并且对细胞膜显现出两亲特性^[15]。

2 抗菌肽的分离纯化及结构鉴定

由于天然抗菌肽在自然环境或有机体组织中含量较低,这给抗菌肽的分离纯化带来一定困难。同时多数抗菌肽结构复杂,不但给结构鉴定带来困难,也导致化学合成这些物质存在技术困难且费用昂贵。因此,从自然界中成功提取分离到足量抗菌肽,并对抗菌肽结构组成进行分析是抗菌肽研究中的关键环节,它是进一步人工合成抗菌肽和深入开展抗菌肽作用机理研究的前提。

2.1 抗菌肽的分离纯化

2.1.1 确定抗菌肽来源

在分离纯化目标抗菌肽前,首要的任务是确定抗菌肽的最初来源,这是大量、高效提取分离抗菌肽的前提和保障。一般认为,对于有机体,若抗菌肽存在于血细胞提取物、淋巴液或体腔液中,此类抗菌肽多

来自于有机机体的免疫系统^[16];若存在于机体暴露于外环境的组织(如皮肤或鱼鳃等)或肠胃等消化道组织中,那么此类抗菌肽很可能来自于膳食衍生物或共生菌、寄生虫的分泌物。例如,1989年从猪小肠中分离得到cecropin P1,当时认为它是由机体细胞合成^[17],但14年后发现此抗菌肽的真正产生者是猪小肠内的一种寄生线虫^[18]。对于存在于食品原料中的抗菌肽,多来源于微生物发酵过程中的次级代谢物^[19]。

2.1.2 分离纯化

2.1.2.1 原料前处理

在分离纯化过程中,选取适当的样品前处理方法对活性肽的提取率起着至关重要的作用,尤其是对于含量较低天然抗菌肽样品(比如海洋无脊椎动物中活性肽的浓度含量通常低于湿重的10⁻⁶%)^[20]。对于体积较大的有机体,若目标肽产生或存在于某个组织或器官,在提取前应解剖分类成不同的组织、器官或体液^[21~22],但有机体太小而难以分割成更小组分时,则需要将整个有机体作为提取分离的对象。对于液态发酵样品,抗菌肽多存在于水相中,需通过离心获取上清液做进一步分离纯化^[23]。

同时,许多前处理因素如实验原料的储藏(温度、时间)、离心(速度、时间、温度)、缓冲液(类型、pH、离子强度、温度)、干燥(温度)等都会潜在的影响到后续所得活性肽的得率、稳定性及实验操作的可重复性。同时需防止提取分离过程中人为加入的试剂或药品对实验结果产生误导,如一些抗凝血剂和蛋白酶抑制剂本身具有一定的抗菌活性,应防止其在纯化过程中产生假阳性对实验结果产生干扰作用。

2.1.2.2 分离纯化步骤选择

实验原料的性质状态和原料中活性肽浓度的差异,导致目前研究者提取分离抗菌肽的方法也各不相同,尚未形成一套标准化的纯化方法。

多数菌肽的分离纯化方案都是基于抗菌肽分子量较小、带正电荷和两亲性等特性,采用多级纯化手段,部分抗菌肽的具体纯化步骤参见表1。综合目前已报道的抗菌肽分离纯化方法,多级纯化步骤归纳起来主要包含以下3个部分:1)提取/沉淀阶段:通过提取/沉淀步骤结合离心和/或超滤方法去除样品中颗粒物和蛋白质;2)预纯化阶段:通常采用尺寸排阻色谱(SEC,也称为凝胶渗透色谱法或凝胶过滤法)、离子交换色谱(IEC)和固相萃取(SPE)等手段,去除样品中无机物(盐),阴离子性的蛋白质,脂肪和其他生物测定干扰物;3)一步或多步的分析纯化阶段:根据疏水性差异,采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)将生物活性肽与非活性肽分开。

表1 部分抗菌肽纯化步骤概述

Table 1 Overview of the purification of some antimicrobial peptides s

抗菌肽	纯化步骤
Penaeidins ^[24]	1) 提取: 5% 乙酸; 2) 固相萃取 (C18); 3) 亲和色谱; 4) 1-4×反相高效液相色谱
SSAP ^[25]	1) 提取: 10% 乙酸; 2) 透析; 3) 离子交换色谱 (阳离子); 4) 超滤; 5) 2×反相高效液相色谱
Arenicins ^[26]	1) 提取: 15% 乙酸; 2) 超滤; 3) 酸性尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳; 4) 反相高效液相色谱
Scygonadin ^[27]	1) 提取: 15% 乙酸+0.1% 三氟乙酸; 2) 离子交换色谱 (阳离子); 3) 反相高效液相色谱
Homarin ^[28]	1) 提取: 10% 乙酸; 2) 2×固相萃取 (亲水亲油); 3) 离子交换色谱 (阳离子); 4) 超滤; 5) SDS-PAGE

以上分离纯化过程中, 通过活性测定试验确定包含活性肽的组分, 以便下一步再进行细分, 直到得到纯的单一活性肽为止, 因此此类纯化方法又称作“活性制导纯化”。

2.2 抗菌肽的结构鉴定

抗菌肽一级结构解析通常采用还原和烷基化, 氨基酸分析, 蛋白水解处理后通过RP-HPLC纯化肽片段, Edman降解, 和/或通过质谱测定获得抗菌肽的碎片信息等技术手段。

目前研究者已对大量新发现抗菌肽的一级结构进行了成功解析, 但研究发现也存在部分抗菌肽采用上述传统方法并不能得到很好地解析。(1) 肽聚合物: 比如二聚肽centrocins^[29]、dicynthaurin^[30]和halocidin^[31], 在Edman降解过程中显示强度相似的双重信号, 最初被误判为肽样品不纯, 但将随后将两条肽链分开纯化单独测序后, 肽链氨基酸序列才最终得以确定。(2) N-末端封闭或包含有其它残基被修饰的多肽: 此类抗菌肽可能会阻止或中断Edman降解测序过程, 并且在氨基酸分析时可能一点都检测不到, 除非采用特定的渐变和使用不寻常的氨基酸标准。在海洋无脊椎动物中发现部分翻译后修饰的抗菌肽, 对于这类抗菌肽的结构解析有必要采用MS分析, 以获得完整的结构鉴定信息。Styelin D^[32]是分离自海鞘类动物血细胞的抗菌肽, 被证明有大量显著的翻译后修饰结构, 如含有像dihydroxyarginine、dihydroxylysine、6-溴色氨酸和3,4-二羟基苯丙氨酸等不寻常氨基酸, 同时由于其赖氨酸残基的单羟基化和二羟基化以及C-末端酰胺化, 使该抗菌肽的序列测定变得异常困难。callinectin^[33]是分离自青蟹血细胞的3.7 kDa的抗菌肽, 由于其N-末端含有一个被氧化的色氨酸而导致一级结构测序无法顺利进行。虽然目前不太了解此类抗菌肽翻译后修饰的发生过程, 但此过程可能是为了保护这些多肽在生物体内合成、分泌时不被自身内源蛋白酶进一步降解, 或不被细菌蛋白酶水解攻击, 延长抗菌肽在体内的存在时间, 该特性虽然在一定程度上增大了抗菌肽结构解析的难度, 但同时也增大了它们开发成为多肽药物的可

能性^[34]。

3 抗菌肽作用机理研究

3.1 研究抗菌肽作用机理的技术手段

目前有多种技术手段用于研究抗菌肽的作用机制, 但每种方法对抗菌肽作用机制提供的视角有所不同, 同时, 往往需要多种技术手段才能全面充分的确定抗菌肽的作用机制^[35]。

3.1.1 显微镜观察法

通过扫描电镜、透射电镜或激光扫描共聚焦显微镜等技术手段观察抗菌肽对菌体细胞的作用效果, 进而可视化的确定抗菌肽对微生物细胞的总体作用靶位是目前多数抗菌肽机理研究中采用的方法。激光扫描共聚焦显微镜表明, magainin 2可以结合到菌体细胞表面, 而buforin II则进入细胞内部, 并且在细菌胞质内积累^[36]。扫描电镜和透射电子显微镜被用来证明抗菌肽如SMAP29对微生物细胞超微结构的损伤作用。微观分析表明, 不同的抗菌肽对菌体细胞作用效果不同, 这表明不同的肽具有不同的靶位或活性机制, 如已经证明的SMAP29和CAP18对铜绿假单胞菌的影响^[37]。

3.1.2 模型膜研究法

与显微镜观察法相比, 用磷脂模型膜评估抗菌肽与磷脂的相互作用更具有针对性。该方法通过制备单一或混合脂质模拟细胞膜或囊泡并与抗菌肽一起温育, 使抗菌肽与模型膜相互作用。抗菌肽的吸引, 附着, 插入和定位, 以及脂质的定位和脂质双分子层的厚度和完整性通过X-射线晶体学, 核磁共振光谱(检测在溶液和脂双分子层中的肽)及傅立叶变换红外光谱(FTIR), 拉曼光谱, 荧光或CD光谱测定。这些方法与抗菌肽作用微生物活性的相关性随着技术的变化而变化。

3.1.3 荧光染料标记法

天蚕素A、蛙皮素2、indolicidin、蜂毒肽、兔中性粒细胞防御素和其他渗透膜囊泡的抗菌肽的作用效果可以通过检测经荧光标记的葡聚糖、免疫球蛋白、钙黄绿素或其他探针的释放情况来确定^[38-42]。作用时

间, 肽浓度和模型膜的组成对已标记探针释放效果的影响可以检测到^[43]。

3.1.4 检测细胞膜上形成的离子通道

监测细胞膜双分子层中形成的电压依赖性通道是评估抗菌肽诱导膜孔形成和稳定性的另一有效技术。抗菌肽附着并穿透双分子层的能力可以通过分析通过膜孔电流的电导率来测定。通过此技术发现, 0.1~10 μM 的天蚕素可以使菌体细胞膜形成4 nm的随时间和电压依赖性变化的离子通道, 此判断结果与通过电镜观察的天蚕素处理大肠杆菌结果可以很好地吻合^[44]。

3.1.5 圆二色谱和定向圆二色谱测定法

抗菌肽的二级结构和脂质双分子层的定向结合情况可以在可控的湿度环境下通过圆二色谱检测^[45-46]。圆二色谱分析发现, 鲨素 I 在20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl(pH 8.0)缓冲液中不是两亲性的, 但在磷脂酰胆碱脂质体存在下呈两亲性^[47], LL-37在溶剂^[48]和脂质中^[49]分别呈现随机的无规则卷曲和 α -螺旋构象。这些例子表明, 细菌的外表面和细胞膜的局部环境对抗菌肽的作用效果有重要影响, 可以诱导抗菌肽的构象发生变化, 而这些变化可以直接影响到抗菌肽插入细胞膜内部。

3.1.6 固态核磁共振波谱法

固态核磁共振波谱可用于检测抗菌肽的二级结构、在细胞膜上的定位及对脂质双分子层的渗透性^[50-52]。固态核磁共振波谱分析发现, 抗菌肽Protegrin与双分子层表面呈约55°倾斜角^[53], protegrin的疏水性主链与磷脂双分子层的疏水性核心相互作用, 使其阳离子精氨酸侧链与双分子层上阴离子磷酸基团相互作用。抗菌肽RTD-1与 Protegrin的初级和次级结构均较为相似, 然而在抗菌肽Protegrin中, 精氨酸残基位于 β -发夹的尾部使其成为一个两亲性分子, 而在RTD-1中, 它们存在于整个分子, RTD-1不对称地与双分子层外侧的磷脂头结合, 诱导细胞膜形成弱的曲率, 导致形成柱状膜^[54]。这些数据有助于确定抗菌肽与细菌细胞膜的相互作用, 以及肽和膜组成对抗菌肽活性的影响。

3.1.7 其他技术

除上述提到的技术手段外, 中子反射法^[55]、X-射线衍射法^[56]等技术也被用于抗菌肽与细胞壁膜的作用机理研究中。

3.2 抗菌肽作用机制

3.2.1 导致细胞膜功能紊乱

病原微生物的细胞质膜肩负着多种基本的生理职能, 包括选择透过性, 维持细胞能量驱动的电子传递和氧化磷酸化, 合成和交联肽聚糖或其他的生物大分

子等。抗菌肽引起的菌体外膜或质膜功能障碍可能干扰到这些功能中的一个或多个, 进而直接或间接地导致细胞死亡。研究表明, 部分抗菌肽可在2~3 min内杀死病原微生物^[57], 这主要是由于菌体细胞膜去极化, 离子和代谢产物泄露, 并且呼吸作用等其他基本功能丧失导致^[58-59]。在革兰氏阴性菌中, 抗菌肽先后与菌体外膜和质膜相互作用, 而导致菌体快速死亡的决定因素是抗菌肽对其质膜的扰动作用。对于革兰氏阳性菌细胞, 抗菌肽可以快速导致菌体细胞渗透调节异常及胞内内容物泄漏^[60]。Yeaman等^[61]研究发现, 抗菌肽可以敏感地影响到菌体细胞膜表面的能量分布, 而膜表面能量分布变化与细胞膜去极化、膜孔形成和杀伤细胞有直接联系。

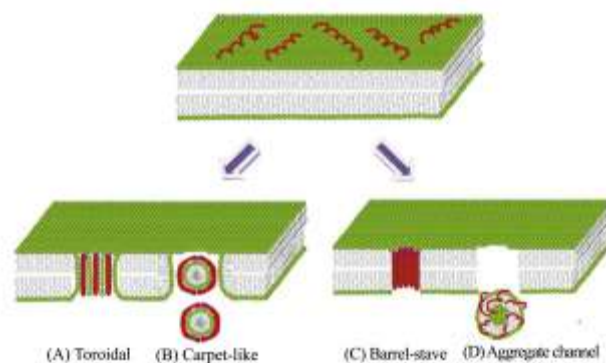


图1 抗菌肽对细胞膜的作用方式^[67]

Fig.1 The action mode of antimicrobial peptides to cell membrane

同时, 关于抗菌肽对细胞膜的作用方式, 目前至少存在四种经典模型(图1), 分别是(1)环孔模型: 即抗菌肽垂直插入磷脂双分子层, 与双分子层亲水头结合, 形成环孔, 导致细胞跨膜电位和渗透调节功能遭到破坏, 呼吸作用被抑制, 最终导致菌体死亡。(2)毯式模型: 该模型认为, 两亲性的抗菌肽分子与细胞膜表面磷脂双分子层的磷脂头相结合, 而亲水性朝向水溶液, 导致大量抗菌肽覆盖在磷脂双分子层表面, 当浓达到一定阈值时磷脂双分子层内外受力不均而变形, 最终导致细胞膜破裂。抗菌肽杀灭革兰氏阴性菌和寄生虫多属于该作用机制, 如抗菌肽Pln149a、LL37和 aurein 1.2^[62-63]。(3)桶板模型: 抗菌肽垂直插入磷脂双分子层, 疏水部分与双分子层内部相互作用, 亲水部分朝向内部形成通道, 因其排列形似水桶上的木排而得名。抗菌肽SK84和Ctx-Ha均是此作用机制^[64-65]。(4)聚集通道模型: 抗菌肽最初竞争性取代与脂多糖关联的二价金属离子(镁离子和钙离子), 扰乱了细胞膜表面大分子组装, 进而有机会同时接触到磷脂双分子层的内外两层膜。通过特殊的脂-肽结合区域进而形成细胞膜表面的离子泄露通道。从澳大利

亚树蛙中分离到的抗菌肽 Maculatin 1.1 即是此种作用机制^[66]。

3.2.2 与菌体细胞生物大分子的作用

抗菌肽抑菌的另一重要作用机制就是抑制菌体细胞生物大分子合成及表达,包括抑制细胞外基质生物大分子合成与表达和抑制细胞内生物大分子合成及功能两大部分^[68],具体作用方式见图2。

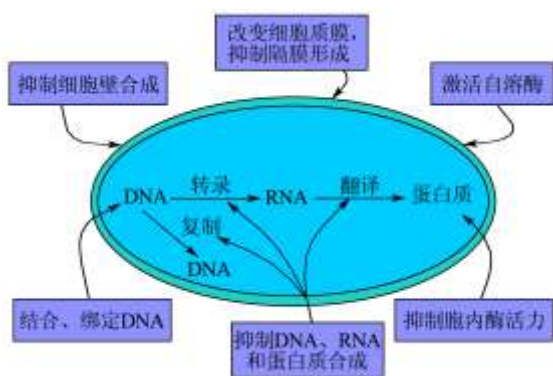


图2 抗菌肽与菌体细胞生物大分子的相互作用

Fig.2 The interactions of antimicrobial peptides with biological macromolecules in bacteria

(1) 抑制细胞外基质生物大分子合成与表达。包括抑制肽聚糖、几丁质,或其它大分子的合成。阳离子抗菌肽或其它肽可干扰细胞膜以及肽聚糖等大分子的前体的合成,转运,和交联,而肽聚糖等生物大分子的合成与膜的完整性和功能密切相关。对于细菌而言,革兰阳性菌含有较多的肽聚糖,可能更容易受这种作用机制的影响,但这种推断有待进一步验证。目前已证明来自于牛科动物精液中的一种抗菌蛋白,可以抑制大肠杆菌肽聚糖的合成^[69]。同样地,抗菌肽可能会以同样或者特异的方式抑制真菌内部几丁质等生物大分子的合成。

(2) 抑制细胞内生物大分子合成及功能。DNA、RNA和胞内蛋白质作为菌体细胞内重要的生物大分子,对细胞生理功能的正常发挥起着至关重要的作用。抗菌肽与菌体胞内DNA、RNA和蛋白质的相互作用已引起人们广泛关注。Pleurocidin和dermaseptin等螺旋肽,PR-39和indolicidin等富含脯氨酸和精氨酸的抗菌肽,防御素HNP-1等抗菌肽可以有效抑制DNA、RNA和蛋白质的合成,在最低抑菌浓度下,pleurocidin和dermaseptin可以在不损害大肠杆菌巨细胞质膜情况下抑制核酸和蛋白质合成^[70-72]。PR-39 (25 μ M)可以阻止蛋白合成并且诱导在DNA复制过程中起关键作用的部分蛋白质降解^[73]。HNP-1和HNP-1 (50 μ g/mL)可以抑制DNA、RNA和蛋白质的合成,同时也可有效抑制周质 β -半乳糖苷酶^[74]。Indolicidin (100 μ g/mL)可以完全抑制大肠杆菌DNA和RNA的合成,但对蛋白质的合成没有

任何作用,当抗菌肽浓度达到150~200 μ g/mL时,菌体蛋白质的合成被明显抑制^[75]。富含脯氨酸的短链抗菌肽Pyrhocoricin, drosocin和apidaecin等可以特异性地绑定一种分子量为70 kDa的热休克蛋白DnaK。Pyrhocoricin降低ATP酶的活力,导致DnaK重组过程受到抑制,同时Pyrhocoricin和drosocin均可导致DnaK蛋白出现错误折叠^[76]。

参考文献

- [1] Hassan M, Kjos M, Nes I F, et al. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance [J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 113(4): 723-736
- [2] Hassan M, Kjos M, Nes I F, et al. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance [J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 113(4): 723-736
- [3] Boman H G, Nilsson I, Rasmuson B. Inducible antibacterial defense system in Drosophila [J]. Nature, 1972, 237: 232-235
- [4] Afshar M, Gallo R L. Innate immune defense system of the skin [J]. Veterinary dermatology, 2013, 24(1): 32-e9
- [5] Hoang V L T, Kim S K. Antimicrobial Peptides from Marine Sources [J]. Current Protein and Peptide Science, 2013, 14(3): 205-211
- [6] Molloy E M, Field D, Cotter P D, et al. Saturation Mutagenesis of Lysine 12 Leads to the Identification of Derivatives of Nisin A with Enhanced Antimicrobial Activity [J]. PloS One, 2013, 8(3): e58530
- [7] De Zotti M, Biondi B, Park Y, et al. Antimicrobial lipopeptide trichogin GA IV: role of the three Aib residues on conformation and bioactivity [J]. Amino acids, 2012, 43(4): 1761-1777
- [8] Li Y, Qu H, Xiang Q, et al. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application [J]. Peptides, 2012, 37(2): 207-215
- [9] Pringsulaka O, Thongngam N, Suwannasai N, et al. Partial characterisation of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products [J]. Food Control, 2012, 23(2): 547-551
- [10] Hayes B M E, Bleackley M R, Wiltshire J L, et al. Identification and mechanism of action of the plant defensin NaD1 as a new member of the antifungal drug arsenal against Candida albicans [J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2013, doi: 10.1128/AAC.00365-13 AAC. 00365-13

- [11] Sperstad S V, Haug T, Blencke H M, et al. Antimicrobial peptides from marine invertebrates: challenges and perspectives in marine antimicrobial peptide discovery [J]. *Biotechnology advances*, 2011, 29(5): 519-530
- [12] Maróti G, Kereszt A, Kondorosi É, et al. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals [J]. *Research in Microbiology*, 2011, 162: 363-374
- [13] Hancock R E, Lehrer R. Cationic peptides: a new source of antibiotics [J]. *Trends Biotechnol*, 1998, 16: 82-88
- [14] Vívcharuk V, Kaznessis Y N. Thermodynamic analysis of protegrin-1 insertion and permeation through a lipid bilayer [J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2011, 115(49): 14704-14712
- [15] Splith K, Neundorf I. Antimicrobial peptides with cell penetrating peptide properties and vice versa [J]. *Eur. Biophys. J.*, 2011, 40: 387-397
- [16] Yeung A T Y, Gellatly S L, Hancock R E W. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2011, 68(13): 2161-2176
- [17] Lee J Y, Boman A, Chuanxin S, et al. *Ascaris* nematodes from pig and human make three antibacterial peptides: isolation of cecropin P1 and two ASABF peptides [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1989, 86: 9159-9162
- [18] Andersson M, Boman A, Boman H G. Antibacterial peptides from pig intestines: isolation of a mammalian cecropin [J]. *Cell Mol. Life Sci.*, 2003, 60: 599-606
- [19] Pringsulaka O, Thongngam N, Suwannasai N, et al. Partial characterisation of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products [J]. *Food Control*, 2012, 23(2): 547-551
- [20] Pettit G R, Kamano Y, Herald C L, et al. The isolation and structure of a remarkable marine animal antineoplastic constituent: Dolastatin 10 [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, 109: 6883-6885
- [21] Niu S F, Jin Y, Xu X, et al. Characterization of a novel piscidin-like antimicrobial peptide from *Pseudosciaena crocea* and its immune response to *Cryptocaryon irritans* [J]. *Fish & shellfish immunology*, 2013, 35(2): 513-524
- [22] Zhang S, Guo H, Shi F, et al. Hainaninins: A novel family of antimicrobial peptides with strong activity from Hainan cascade-frog, *Amolops hainanensis* [J]. *Peptides*, 2012, 33(2): 251-257
- [23] ASAHINA T, HARA K, ARAKAWA K, et al. Production of bacteriocin by *Leuconostoc mesenteroides* 406 isolated from Mongolian fermented mare's milk, airag [J]. *Animal Science Journal*, 2012, 83(10): 704-711
- [24] Arenas G, Guzmán F, Cárdenas C, et al. A novel antifungal peptide designed from the primary structure of a natural antimicrobial peptide purified from *Argopecten purpuratus* hemocytes [J]. *Peptides*, 2009, 30(8): 1405-1411
- [25] Yedery R D, Rami Reddy K V. Purification and characterization of antibacterial proteins from granular hemocytes of Indian mud crab, *Scylla serrata* [J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2009, 56(1): 71
- [26] Ovchinnikova T V, Aleshina G M, Balandin S V, et al. Purification and primary structure of two isoforms of arenicin, a novel antimicrobial peptide from marine polychaeta *Arenicola marina* [J]. *FEBS letters*, 2004, 577(1): 209-214
- [27] Huang W S, Wang K J, Yang M, et al. Purification and part characterization of a novel antibacterial protein Scygonadin, isolated from the seminal plasma of mud crab, *Scylla serrata* (Forskål, 1775) [J]. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 2006, 339(1): 37-42
- [28] Battison A L, Summerfield R, Patrzykat A. Isolation and characterisation of two antimicrobial peptides from haemocytes of the American lobster *Homarus americanus* [J]. *Fish & shellfish immunology*, 2008, 25(1): 181-187
- [29] Li C, Haug T, Moe M K, et al. Centrocins: isolation and characterization of novel dimeric antimicrobial peptides from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis* [J]. *Dev. Comp. Immunol.*, 2010b, 34: 959-968
- [30] Jang W S, Kim K N, Lee Y S, et al. Halocidin: a new antimicrobial peptide from hemocytes of the solitary tunicate, *Halocynthia aurantium* [J]. *FEBS Lett.*, 2002, 521: 81-86
- [31] Lee I H, Lee Y S, Kim C H, et al. Dicynthaurin: an antimicrobial peptide from hemocytes of the solitary tunicate, *Halocynthia aurantium* [J]. *Biochem. Biophys. Acta.*, 2001a, 1527: 141-148
- [32] Taylor S W, Craig A G, Fischer W H, et al. Styelin D, an extensively modified antimicrobial peptide from ascidian hemocytes [J]. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275: 38417-38426
- [33] Noga E J, Stone K L, Wood A, et al. Primary structure and cellular localization of callinectin, an antimicrobial peptide from the blue crab [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(4): 409-415
- [34] Matheson S M G, Cheeptham N, Huttunen-Hennelly H E K. Investigating the Effects of Hydrophobicity and Charge on the Therapeutic Ability of the Antimicrobial Histatin 8 Peptide for Potential Use in Oral Applications [J].

- International Journal of Biology, 2013, 5(2): 85
- [35] Kim A Brogden. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? [J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3: 238-250
- [36] Park C B, Yi K S, Matsuzaki K, et al. Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II [J]. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2000, 97(15): 8245-8250
- [37] Kalfa V C, Jia H P, Kunkle R A, et al. Congeners of SMAP29 kill ovine pathogens and induce ultrastructural damage in bacterial cells [J]. Antimicrob. Agents. Chemother., 2001, 45: 3256-3261
- [38] Ladokhin A S, Selsted M E, White S H. Sizing membrane pores in lipid vesicles by leakage of coencapsulated markers: pore formation by melittin [J]. Biophys. J., 1997, 72: 1762-1766
- [39] Matsuzaki K, Yoneyama S, Miyajima K. Pore formation and translocation of melittin [J]. Biophys. J., 1997, 73: 831-838
- [40] Kang J H, Shin S Y, Jang S Y, et al. Release of aqueous contents from phospholipid vesicles induced by cecropin A (1-8) magainin 2 (1-12) hybrid and its analogues [J]. J. Peptide Res., 1998, 52: 45-50
- [41] Hristova K, Selsted M E, White S H. Critical role of lipid composition in membrane permeabilization by rabbit neutrophil defensins [J]. J. Biol. Chem., 1997, 272: 24224-24233
- [42] Zhao H, Mattila J P, Holopainen J M, et al. Comparison of the membrane association of two antimicrobial peptides, magainin 2 and indolicidin [J]. Biophys. J., 2001, 81: 2979-2991
- [43] Matsuzaki K, Murase O, Miyajima K. Kinetics of pore formation by an antimicrobial peptide, magainin 2, in phospholipid bilayers [J]. Biochemistry, 1995, 34: 12553-12559
- [44] Christensen B, Fink J, Merrifield R B, et al. Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes [J]. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1988, 85: 5072-5076
- [45] Balakrishnan V S, Vad B S, Otzen D E. Novicidin's membrane permeabilizing activity is driven by membrane partitioning but not by helicity: A biophysical study of the impact of lipid charge and cholesterol [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2013, 1834(6): 996-1002
- [46] Fernandez D I, Sani M A, Miles A J, et al. Membrane defects enhance the interaction of antimicrobial peptides, aurein 1.2 versus caerin 1.1 [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2013, 1828(8): 1863-1872
- [47] Oishi O, Yamashita S, Nishimoto E, et al. Conformations and orientations of aromatic amino acid residues of tachyplesin I in phospholipid membranes [J]. Biochemistry, 1997, 36: 4352-4359
- [48] Johansson J, Gudmundsson G H, Rottenberg M E, et al. Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37 [J]. J. Biol. Chem., 1998, 273: 3718-3724
- [49] Turner J, Cho Y, Dinh N N, et al. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils [J]. Antimicrob. Agents Chemother., 1998, 42: 2206-2214
- [50] Kim C, Wi S. A Solid-state NMR Study of the Kinetics of the Activity of an Antimicrobial Peptide, PG-1 on Lipid Membranes [J]. Bull. Korean Chem. Soc, 2012, 33(2): 427
- [51] Su Y, Li S, Hong M. Cationic membrane peptides: atomic-level insight of structure-activity relationships from solid-state NMR [J]. Amino acids, 2013, 44(3): 821-833
- [52] Bertelsen K, Dorosz J, Hansen S K, et al. Mechanisms of Peptide-Induced Pore Formation in Lipid Bilayers Investigated by Oriented 31P Solid-State NMR Spectroscopy [J]. PloSone, 2012, 7(10): e47745
- [53] Yamaguchi S, Hong T, Waring A, et al. Solid-state NMR investigations of peptide-lipid interaction and orientation of a β -sheet antimicrobial peptide, protegrin [J]. Biochemistry, 2002, 41: 9852-9862
- [54] Buffy J J, McCormick M J, Wi S, et al. Solid-state NMR investigation of the selective perturbation of lipid bilayers by the cyclic antimicrobial peptide RTD-1 [J]. Biochemistry, 2004, 43(30): 9800-9812
- [55] Fernandez D I, Le Brun A P, Bansal P, et al. Neutron Reflectivity Studies of the Antimicrobial Peptide Maculatin 1.1 in Supported Lipid Bilayers [J]. Biophysical Journal, 2011, 100(3): 334a
- [56] Bastos M, Silva T, Teixeira V, et al. Lactoferrin-derived antimicrobial peptide induces a micellar cubic phase in a model membrane system [J]. Biophysical journal, 2011, 101(3): L20-L22
- [57] Lehrer R I, Barton A, Daher K A, et al. Interaction of human defensins with Escherichia coli. Mechanism of bactericidal activity [J]. J Clin Invest, 1989, 84: 553-561

- [58] Blondelle S E, Lohner K, Aguilar M. Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity [J]. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1999, 1462: 89-108
- [59] Hancock R E, Chapple D S. Peptide antibiotics [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43: 1317-1323
- [60] Brijesh K P, Saurabh S, Manish S, et al. Inducing toxicity by introducing a leucine-zipper-like motif in frog antimicrobial peptide, magainin 2 [J]. *Biochemical journal*, 2011, 436(3): 609-620
- [61] Yeaman M R, Bayer A S, Koo S P, et al. Platelet microbicidal proteins and neutrophil defensin disrupt the *S. aureus* cytoplasmic membrane by distinct mechanisms of action [J]. *J. Clin. Invest.*, 1998, 101: 178-187
- [62] Dean R E, O'Brien L M, Thwaite J E, et al. A carpet-based mechanism for direct antimicrobial peptide activity against vaccinia virus membranes [J]. *Peptides*, 2010, 31(11): 1966-1972
- [63] Fernandez D I, Le Brun A P, Whitwell T C, et al. The antimicrobial peptide aurein 1.2 disrupts model membranes via the carpet mechanism [J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2012, 14(45): 15739-15751
- [64] Lu J, Chen Z. Isolation, characterization and anti-cancer activity of SK84, a novel glycine-rich antimicrobial peptide from *Drosophila virilis* [J]. *Peptides*, 2010, 31(1): 44-50
- [65] Ferreira Cespedes G, Nicolas Lorenzon E, Festozo Vicente E, et al. Mechanism of action and relationship between structure and biological activity of Ctx-Ha: a new ceratotoxin-like peptide from *Hypsiboas albopunctatus* [J]. *Protein and Peptide Letters*, 2012, 19(6): 596-603
- [66] Parton D L, Akhmatkaya E V, Sansom M S P. Multiscale simulations of the antimicrobial peptide maculatin 1.1: water permeation through disordered aggregates [J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2012, 116(29): 8485-8493
- [67] Li Y, Qu H, Xiang Q, et al. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application [J]. *Peptides*, 2012, 37(2): 207-215
- [68] Brogden K A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3: 238-250
- [69] Chitnis S N, Prasad K S. Seminalplasmin, an antimicrobial protein from bovine seminal plasma, inhibits peptidoglycan synthesis in *Escherichia coli* [J]. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1990, 60: 281-284
- [70] Cho J Y, Choi H, Hwang J S. The Novel Biological Action of Antimicrobial Peptides via Apoptosis Induction [J]. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2012, 22(11): 1457-1466
- [71] Fabbretti A, Brandi L, Petrelli D, et al. The antibiotic Furvina® targets the P-site of 30S ribosomal subunits and inhibits translation initiation displaying start codon bias [J]. *Nucleic acids research*, 2012, 40(20): 10366-10374
- [72] Patrzykat A, Friedrich C L, Zhang L, et al. Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob [J]. Agents Chemother*, 2002, 46: 605-614
- [73] 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 [J]. *Infect. Immun.*, 1993, 61: 2978-2984
- [74] Lehrer R I, Barton A, Daher K A, et al. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity [J]. *J. Clin. Invest.*, 1989, 84: 553-561
- [75] Subbalakshmi C, Sitaram N. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin [J]. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1998, 160: 91-96
- [76] Otvos L J, Rogers M E, Consolvo P J, et al. Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides [J]. *Biochemistry*, 2000, 39: 14150-14159