

# 新型阳离子两亲性人工多肽的体外抗菌及抗肿瘤作用研究

黄圆 王晓炜 王晓稼

**[摘要]** **目的** 研究新型阳离子两亲性人工多肽C(LLKK)2C、(LLKK)2C对革兰阳性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)及革兰阴性大肠埃希菌的体外抗菌作用及对人大肠癌细胞株HCT116、人乳腺癌细胞株MCF-7的细胞毒性作用。**方法** 采用最小抑菌浓度试验(MICs)检测C(LLKK)2C、(LLKK)2C对MRSA及大肠埃希菌的体外抗菌作用,通过体外细胞毒性试验(MTT)检测该系列多肽对人大肠癌细胞株HCT116、人乳腺癌细胞株MCF-7的体外细胞毒性,透射式电子显微镜观察MRSA细菌经(LLKK)2C处理后形态学变化。**结果** C(LLKK)2C、(LLKK)2C对MRSA的最小抑菌浓度分别是40 mg/L、20 mg/L,对大肠埃希菌的最小抑菌浓度分别为>160 mg/L、75 mg/L。经160 mg/L C(LLKK)2C或(LLKK)2C处理48 h后,HCT116的细胞存活率分别为(66.86 ± 5.01)%、(6.36 ± 1.65)%,MCF-7的细胞存活率分别为(73.11 ± 5.31)%、(1.99 ± 1.08)%,差异均有统计学意义( $t$ 分别=28.08、32.16, $P$ 均<0.05)。电镜下观察发现经(LLKK)2C处理的MRSA菌体发生细菌细胞膜结构破坏,内容物渗漏。**结论** 多肽末端经侧链携带游离硫醇基团的L-半胱氨酸残基修饰后,一侧半胱氨酸修饰的(LLKK)2C的体外抗菌及抗肿瘤活性优于双侧末端半胱氨酸修饰的C(LLKK)2C,其作用机制可能是由于非对称性的末端硫醇基团更容易破坏细菌及细胞的细胞膜。

**[关键词]** 人工多肽; 硫醇基团; 抗菌; 抗肿瘤; 膜破坏

**Anti-microbial and anti-tumor effects of novel synthetic cationic amphiphilic peptides in vitro** HUANG Yuan, WANG Xiaowei, WANG Xiaojia. Department of Chemotherapy, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the in-vitro antimicrobial effects of novel cationic amphiphilic peptides C(LLKK)2C, (LLKK)2C against gram-positive Methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) and gram-negative Escherichia coli (E.coil) and the cytotoxicity effects of them against human colon cancer cell line HCT116 and human breast cancer cell line MCF-7. **Methods** The minimum inhibitory concentrations (MICs) of these peptides against MRSA and E.coil were determined to evaluate the in-vitro antimicrobial effects of C(LLKK)2C, (LLKK)2C. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was performed to measure the peptide-induced cytotoxicity in HCT116 and MCF-7. The morphology of MRSA after the treatment with the (LLKK)2C peptide was observed under a transmission electron microscope (TEM). **Results** The MICs of C(LLKK)2C and (LLKK)2C against MRSA were 40mg/L and 20 mg/L. The MICs of C(LLKK)2C and (LLKK)2C against E.coil were >160 mg/L and 75 mg/L respectively. After 48 hours treatment of 160 mg/L C(LLKK)2C or (LLKK)2C, the cell survival rates of HCT116 were (66.86 ± 5.01)% and (6.36 ± 1.65)%, and the cell survival rates of MCF-7 were (73.11 ± 5.31)% and (1.99 ± 1.08)%, the differences were statistically significant ( $t=28.08, 32.16, P < 0.05$ ).

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2016.06.005  
基金项目:浙江省自然科学基金(LQ16H160012)  
作者单位:310022 浙江杭州,浙江省肿瘤医院化疗中心(黄圆、王晓稼);邵逸夫医院肛肠外科(王晓炜)  
通讯作者:王晓稼,Email: wxiaojia0803@163.com

TEM micrographs of the (LLKK)2C-treated MRSA showed that the treatment induced cell membrane lysis and release of cytoplasmic content from the bacteria. **Conclusion** By modifying the end-terminal(s) of the peptides with L-cysteine residue, which

carries free-thiol functionality on its side group, the antimicrobial and antitumor effects of the peptide (LLKK)2C with one cysteine residue were greater than that of the peptide C (LLKK)2C with two cysteine residues, which implies that asymmetric thiol functional group incorporation is more likely to induce cell membrane disruption.

**[Key words]** syntheti peptides; thiol functional group; antimicrobial; antitumor; membrane disruption

随着临床抗菌及抗肿瘤药物的广泛应用,由此产生的药物耐药成为亟需解决的棘手难题。新型生物材料技术的研发为该临床困境提供了崭新思路。由机体固有免疫系统分泌产生的天然抗菌肽不仅具有广谱抗菌作用<sup>[1]</sup>,还能杀伤原虫、病毒及肿瘤细胞<sup>[2-3]</sup>。本课题前期研究通过模拟天然抗菌肽结构特征设计了阳离子两亲性  $\alpha$  螺旋人工多肽 C(LLKK)2C、(LLKK)2C,其中亮氨酸(leucine,L)是疏水氨基酸,赖氨酸(lgsine,K)是阳离子氨基酸,C是侧链携带游离硫醇基团的 L-半胱氨酸残基,本次研究将评估末端硫醇基团修饰对人工多肽的杀菌及抗肿瘤活性的影响,从而为进一步研究和开发具有临床实用价值的人工多肽奠定重要基础。

## 1 材料和方法

**1.1 实验材料** 人工多肽委托上海吉尔公司合成,储存于  $-20^{\circ}\text{C}$ ,实验时加入灭菌水稀释至 10 mg/ml 作为起始浓度,之后加入新鲜培养基配置对应的药物浓度。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant staphylococcus aureus,MRSA)及大肠埃希菌细菌菌株由浙江大学附属第一医院的患者血液中分离并经实验室鉴定。大肠癌细胞株 HCT116、人乳腺癌细胞株 MCF-7 购买自 ATCC。本实验于 2012 年 1 月份至 2016 年 7 月份在浙江大学附属医学院完成。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 细菌及细胞培养** MRSA 和大肠埃希菌用 20%的甘油冻存在  $-80^{\circ}\text{C}$ ,实验前用 Mueller-Hinton (M-H)培养基(Oxoid)在  $37^{\circ}\text{C}$ 摇床培养。HCT116 和 MCF-7 培养于含 10%胎牛血清、1%双抗(青链霉素)的 DMEM 高糖培养基中,置于  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养,取对数生长期细胞用于实验。

**1.2.2 最小抑菌浓度实验(minimum inhibitory concentrations, MICs)** 采用微量肉汤稀释法测定 MICs。取少量大肠埃希菌和 MRSA 的冻存菌液加入 M-H 培养液内,置于  $37^{\circ}\text{C}$ 摇床培养过夜。用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)稀释菌液调整到

1 个麦氏比浊标准的菌悬液,此时菌液浓度约为  $3 \times 10^8$  CFU/mL。经 M-H 培养液 1:100 稀释后,菌液即为上样菌液。将倍比稀释后不同浓度的多肽 100  $\mu\text{l}$  分别加到灭菌 96 孔板中,每孔加入 100  $\mu\text{l}$  菌液,置于  $37^{\circ}\text{C}$ 孵箱中孵育 16 h。肉眼观察并用酶标仪测定 600 nm 波长的吸光度值(optical density,OD),以小孔内完全抑制细菌生长的最低药物浓度为 MICs。当阳性对照孔(即不含多肽)内细菌明显生长试验才有意义。

**1.2.3 体外抗增殖实验**[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay, MTT] MTT 试验检测多肽体外抗增殖作用。HCT116、MCF-7 细胞分别消化接种 96 孔板(每孔含细胞约 5 000 个),培养过夜。不同浓度多肽处理 48 h,每个浓度梯度设 6 个复孔。多肽浓度梯度为 0、5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、40 mg/L、80 mg/L、160 mg/L。每孔各加入 15  $\mu\text{l}$  浓度为 5  $\mu\text{g/ml}$  的 MTT 溶液继续培养 3 h 后,离心吸去各孔上清液,加入 200  $\mu\text{l}$  DMSO;振荡溶解结晶;用酶标仪测定 570 nm 波长的 OD 值,取均数;按公式计算细胞存活率。

存活率 = 处理组 OD 值 / 对照组 OD 值  $\times 100\%$

**1.2.4 透射式电子显微镜观察** 细胞接种至底部铺有盖玻片的六孔板,孵育 48 h 让细胞爬上玻片,形成单细胞层,各孔分别加入 2 倍 MIC 浓度的 (LLKK)2C 或 0.9%氯化钠溶液,处理 1 h 后,用 2.5%戊二醛固定送检电镜室,行脱水、包埋、切片、染色一系列标准流程,最后透射式电子显微镜下观察细胞亚显微结构。

**1.3 统计学方法** 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析。计量数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )或均值及 95%置信区间(95% CI)表示,并采用单因素方差分析和 *t* 检验进行比较。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 人工多肽 C (LLKK)2C、(LLKK)2C 对 MRSA、大肠埃希菌抗菌作用的比较** 见图 1

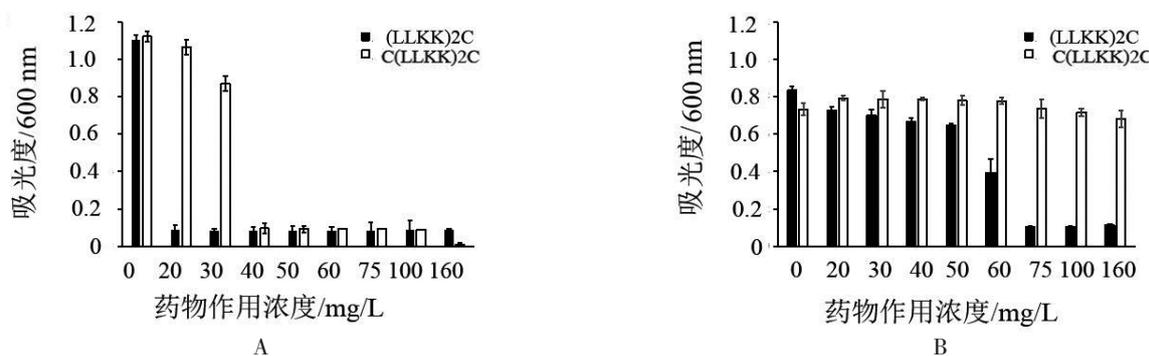


图1 人工多肽C(LLKK)2C、(LLKK)2C对MRSA(A)和大肠埃希菌(B)的生长抑制作用

由图1可见, MICs 实验结果表明 C(LLKK)2C、(LLKK)2C 对 MRSA 的最小抑菌浓度分别是 40 mg/L、20 mg/L, 两组最小抑菌浓度比较, 差异有统计学意义 ( $t=16.10, P<0.05$ ), C(LLKK)2C、(LLKK)2C 对

大肠埃希菌的最小抑菌浓度分别为  $>160$  mg/L、75 mg/L。

2.2 人工多肽 C(LLKK)2C、(LLKK)2C 对 HCT116、MCF-7 细胞毒性作用的比较见图 2

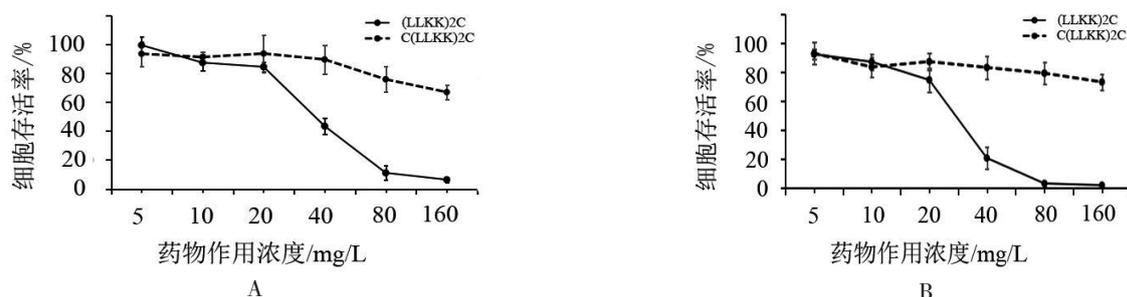


图2 人工多肽 C(LLKK)2C、(LLKK)2C 对人大肠癌细胞株 HCT116(A)和人乳腺癌细胞株 MCF-7(B)的体外抗增殖作用

如图 2 所示, 当 C(LLKK)2C、(LLKK)2C 处理浓度均为 160 mg/L 时, HCT116 的细胞存活率分别为  $(66.86 \pm 5.01)\%$ 、 $(6.36 \pm 1.65)\%$ , MCF-7 的细胞存活率分别为  $(73.11 \pm 5.31)\%$ 、 $(1.99 \pm 1.08)\%$ , 差异均有统计学意义 ( $t$  分别 = 28.08、32.16,  $P$  均  $<0.05$ )。

2.3 MRSA 经人工多肽 (LLKK)2C 处理后亚显微结构变化见图 3、图 4

由封三图 3 可见, 电镜下观察发现 0.9% 氯化钠溶液处理的 MRSA 菌体呈圆形或椭圆形, 胞膜完整, 胞质均一。由封三图 4 可见, 2 倍 MIC 浓度 (LLKK)2C 处理 1 h 后, MRSA 细菌出现胞质疏松、空泡化及细菌细胞膜结构破坏, 内容物渗漏等形态变化。

### 3 讨论

最初人们从昆虫体内发现并分离出具有广谱抗菌活性的阳离子两亲性多肽, 称为抗菌肽 (antimicrobial peptides, AMPs), 天蚕蛹产生的天蚕素是首个被发现的 AMPs<sup>[4,5]</sup>。AMPs 普遍存在生物体内, 由机体固有免疫系统分泌产生以抵御外界入侵, 一

般由 40 个以内的氨基酸组成, 不仅对革兰氏阴性及阳性细菌具有高效广谱的杀伤作用<sup>[1]</sup>, 还能杀伤真菌、原虫、病毒及肿瘤细胞<sup>[2,3]</sup>, 并具有免疫调节功能<sup>[6]</sup>。AMPs 的抗菌作用同其带正电荷的特性及两亲性的二级结构相关<sup>[7]</sup>。目前主要认为是 AMPs 的阳离子区域与细菌表面的负电荷区域如革兰阴性菌外膜的脂多糖或者革兰阳性菌细胞壁的肽聚糖静电吸引, 接着 AMPs 疏水区域插入细胞膜的磷脂双分子层, 破坏膜的完整性, 改变其通透性, 导致细胞内容物泄漏, 最终细菌裂解<sup>[8,9]</sup>。此外, 天蚕素、蛙皮素、防御素等天然 AMPs 均被证实具有抗肿瘤作用。阳离子多肽和表面带负电荷的细菌之间存在的静电吸引作用是 AMPs 抗菌作用的关键因素, 而部分 AMPs 可能因为该类似机制而同时具有抗肿瘤作用。

由于临床药物包括抗生素、细胞毒性化疗药物的普遍广泛应用, 由此产生的药物获得性耐药现象已成为不容忽视的临床困境。近年来, 随着医学及其交叉学科, 尤其是生物材料技术的迅速发展, AMPs 的相关研究及进展为当前临床治疗手段提供

了崭新的模式。本次研究先前通过模拟天然抗菌肽的结构特征设计并合成新型阳离子两亲性  $\alpha$  螺旋人工多肽 C(LLKK)2C、(LLKK)2C。多肽的序列设计基于天然抗菌肽的共性特征:主链结构同时包含阳离子和疏水性氨基酸残基;多肽在水溶液里呈松散结构,在磷脂膜环境下可以折叠形成  $\alpha$  螺旋两亲二级结构特征。并且,C(LLKK)2C、(LLKK)2C 经侧链携带游离硫醇基团的 L- 半胱氨酸残基修饰进一步增强其生物学活性<sup>[10,11]</sup>。本次研究结果显示,C(LLKK)2C、(LLKK)2C 对革兰氏阳性 MRSA 的抗菌作用( $P < 0.05$ )明显优于革兰氏阴性大肠埃希菌,且 (LLKK)2C 的体外抗菌作用比 C(LLKK)2C 强。MTT 实验显示(LLKK)2C 对 HCT116、MCF-7 细胞的体外细胞毒性作用明显大于 C(LLKK)2C( $P$  均  $< 0.05$ )。由此可见,一侧末端含半胱氨酸的 (LLKK)2C 的体外抗菌及抗肿瘤活性优于双侧末端含半胱氨酸的 C(LLKK)2C。

天然抗菌肽的抗菌作用同其带正电荷的特性及两亲性二级结构相关,但具体作用机制尚不明确。阳离子抗菌肽在水溶液里呈松散结构,当和生物膜结合后线性多肽会形成两亲二级结构,如形成  $\alpha$  螺旋,两亲结构的阳离子区域与生物膜表面的负电荷区域静电吸引,接着抗菌肽疏水区域插入富含负电荷脂质的细胞膜,通过一系列可能机制破坏细胞膜磷脂双分子层的完整性,改变其通透性,导致内容物泄漏,细菌裂解<sup>[8,9]</sup>。本次研究利用电镜对比 MRSA 细菌经 0.9%氯化钠和 (LLKK)2C 处理后的亚显微结构,结果发现(LLKK)2C 处理后细菌发生细胞膜结构破坏,内容物渗漏等形态变化,表明人工合成抗菌肽(LLKK)2C 的抗菌及抗肿瘤的作用机制和天然抗菌肽类似,很可能主要也是膜裂解作用,而一侧半胱氨酸修饰的(LLKK)2C 的体外抗菌及抗肿瘤活性优于双侧末端半胱氨酸修饰的 C(LLKK)2C,其原因很可能是由于非对称性的末端硫醇基团更容易破坏细菌及细胞的细胞膜。

本次研究关于 C(LLKK)2C、(LLKK)2C 结构与功能的探讨为后续研究和开发具有临床实用价值的人工多肽奠定理论基础,然而该系列多肽在抗菌

和抗肿瘤作用方面的具体机制仍有待进一步研究。

#### 参考文献

- 1 Mygind PH, Fischer RL, Schnorr KM, et al. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus[J]. *Nature*, 2005, 437(7061):975-980.
- 2 Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms[J]. *Nature*, 2002, 415:389-95.
- 3 Mader JS, Hoskin DW. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2006, 15(8):933-46.
- 4 Steiner H, Hultmark D, Engstrom A, et al. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity[J]. *Nature*, 1981, 292(5820):246-248.
- 5 Steiner H. Secondary structure of the cecropins: antibacterial peptides from the moth *Hyalophora cecropia* [J]. *FEBS Lett*, 1982, 137(2):283-287.
- 6 Acosta J, Carpio Y, Valdés I, et al. Co-administration of tilapia alpha-helical antimicrobial peptides with subunit antigens boost immunogenicity in mice and tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Vaccine*, 2014, 32(2):223-229.
- 7 Wiradharma N, Sng MY, Khan M, et al. Rationally designed  $\alpha$ -helical broad-spectrum antimicrobial peptides with idealized facial amphiphilicity [J]. *Macromol Rapid Commun*, 2001, 34(1):74-80.
- 8 Sato H, Feix JB. Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1758(9):1245-1256.
- 9 Chen L, Li X, Gao L, et al. Theoretical insight into the relationship between the structures of antimicrobial peptides and their actions on bacterial membranes[J]. *J Phys Chem B*, 2015, 119(3):850-860.
- 10 Wiradharma N, Khoe U, Hauser CA, et al. Synthetic cationic amphiphilic  $\alpha$ -helical peptides as antimicrobial agents[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(8):2204-2212.
- 11 Wiradharma N, Khan M, Yong LK, et al. The effect of thiol functional group incorporation into cationic helical peptides on antimicrobial activities and spectra [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(34):9100-9108.

(收稿日期 2016-09-25)

(本文编辑 蔡华波)