

• 综 述 •

Cathelicidins 结构与功能的关系及其分子设计研究进展

王晨¹, 冯兰¹, 于海宁¹, 王义鹏²

1 大连理工大学 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116024

2 苏州大学 药学院, 江苏 苏州 215123

王晨, 冯兰, 于海宁, 等. Cathelicidins 结构与功能的关系及其分子设计研究进展. 生物工程学报, 2017, 33(1): 27–35.

Wang C, Feng L, Yu HN, et al. Relationship between structure and function of cathelicidins and their molecular design: a review. Chin J Biotech, 2017, 33(1): 27–35.

摘 要: Cathelicidins 作为大多数脊椎动物所特有的宿主防御肽, 除了具有高效广谱的抗菌活性外, 还具有如抗炎症、伤口修复、抑制组织损伤和促进血管生成等重要活性, 因此成为蛋白多肽类新药研发热点。近年来, 以其为模板进行的结构改造主要有以下几类: 通过点突变、氨基酸替换、活性片段拼接、化学修饰以及轭合物和二聚体构建等手段提高 cathelicidins 的生物学活性; 通过添加或删减氨基酸残基和破坏 Leu 和 Phe 拉链结构等手段可以降低 cathelicidins 的细胞毒性和溶血活性; 通过 D-型氨基酸替换 L-型氨基酸、构建环形和固位型 cathelicidins 的方式增强其体内外稳定性等。

关键词: Cathelicidins, 结构, 功能, 分子设计, 稳定性

Relationship between structure and function of cathelicidins and their molecular design: a review

Chen Wang¹, Lan Feng¹, Haining Yu¹, and Yipeng Wang²

1 School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China

2 College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu, China

Abstract: Cathelicidins play critical roles in mammalian innate immune defense against invasive bacterial infection. In

Received: June 24, 2016; **Accepted:** September 6, 2016

Supported by: Research Projects of Liaoning Ocean and Fisher Administration (No. 201404), Suzhou Science and Technology Development Project (Nos. SYN201407, SYN201504), Haimen Science and Technology Development Project (No. 2015NY06), Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20160336), Natural Science Foundation of College in Jiangsu Province (No. 16KJB35004).

Corresponding author: Haining Yu. Tel/Fax: 86-411-84708850; E-mail: yuhaining@dlut.edu.cn

辽宁海洋与渔业厅项目 (No. 201404), 苏州市科技计划应用基础项目 (Nos. SYN201407, SYN201504), 海门市科技计划 (No. 2015NY06) 江苏省自然科学基金 (No. BK20160336), 江苏省高校自然科学基金 (No. 16KJB35004) 资助。

addition to their broad-spectrum bactericidal effect, cathelicidins are interesting peptide-based drug templates because they have multiple functions including anti-inflammatory, wound healing, and angiogenesis promotion. This article summarizes the aim and method of cathelicidin molecular designs. Residue mutation, fragment assembly, chemical modification, and construction of conjugates and dimers are usually used to increase the biological activities. Addition or deletion of certain residues, disruption of leucine zipper and phenylalanine zipper are used to reduce the hemolysis and cytotoxicity. By substituting L-amino acids with D-amino acids, circular constructions and immobilization, cathelicidins' *in vitro* and *in vivo* stability could be greatly enhanced, especially their proteinase resistance.

Keywords: cathelicidins, structure, function, molecular design, stability

当今抗生素的过度滥用引起的多重耐药菌感染导致每年至少有 25 000 名患者死亡, 因此寻找传统抗生素的替代品已成为医学界急需解决的难题^[1-3]。脊椎动物所特有的宿主防御肽 cathelicidins (CATHs) 由于具有高效广谱的抗菌活性, 以及抑制组织损伤、抗炎症、伤口修复和促进血管生成等一系列免疫调节活性, 成为蛋白多肽类新药尤其是新型抗生素的研发热点。然而, 生物活性不够强、具有溶血及细胞毒性、容易被蛋白酶降解等缺点却限制了其广泛应用。因此以 cathelicidins 为模板进行的分子设计与改造近年也有了很快发展。

1 Cathelicidin 简介

CATHs 是一类广泛存在于脊椎动物体内的宿主防御肽, 其前体由 N-端信号肽、高度保守的 cathelin 区和高度特异的 C-末端成熟肽构成, 具有广谱抗菌活性^[4]。常见 CATHs 二级结构有 α 螺旋、 β 折叠、延伸-螺旋和不太多见的环状结构^[5]。1) α -螺旋类 CATHs: 分子结构以 α 螺旋为主, 具有很好的两亲性, 通常无分子内二硫键, N-端含有较多的亲水氨基酸, C-端富含疏水氨基酸。人源 LL-37 为此类的典型代表^[6]。2) β -折叠类 CATHs: 具有反向平行的 β 折叠结构, 其分子内有 4 个保守的 Cys 可形成 2 个二硫键, 可起到稳定多肽结构的作用, 如猪 CATHs:

PG-1^b、PG-2^b、PG-3^b、PG-4^b 和 PG-5^b 等^[7]。

3) 延伸-螺旋型 CATHs: 该类 CATHs 不形成典型的二级结构, 也不形成分子内二硫键, 但是通常富含某些特定的氨基酸残基 (AA), 如: Arg、Trp 和 Pro。常见的有富含 Arg 和 Pro 的 PR-39^[8]以及富含 Trp 的 Indolicidin^[9]。4) 环状 CATHs: 分子内含有一个二硫键, 整体呈现环链结构, 大多两栖类蛙来源的 CATHs, 还有绵羊的 OaDode 和牛的 Dodecapeptide^[10]均为此结构。本文将针对不同 CATHs 的结构与功能、作用机制与成药性特征进行的结构改造手段进行综述。

2 Cathelicidins 杀菌机理及特点

大部分 CATHs 家族抗菌肽具有两亲性的 α -螺旋结构并且富含带正电荷的 AA。含有磷壁酸的革兰氏阳性菌 (G⁺菌) 细胞壁以及含有脂多糖的革兰氏阴性菌 (G⁻菌) 细胞壁均带负电荷, 而带正电荷的 CATHs 可以首先通过静电吸附聚集至细菌表面, 进而发挥破坏微生物膜形态的作用^[11]。虽然目前作用机制仍不明确, 但普遍推测此类抗菌肽可以通过“地毯”或者“桶板”模型两种机制破坏微生物细胞膜, 发挥抗菌作用。“地毯”模型通常需要 CATHs 富含正电荷 AA, 但不需要具有特定的二级结构。阳离子 CATHs 与细菌细胞膜的磷脂双分子层中带负电的磷脂分子头基相互静电吸引, CATHs 以地

毯式覆盖在细菌细胞膜表面,通过转动最终使亲水侧朝向磷脂分子头基,疏水侧朝向疏水核心破坏细胞膜,导致细菌裂解死亡,如 LL-37^[12]。与“地毯”模型不同的是,“桶板”模型既需要 CATHs 富含阳离子又需要特定的二级结构使其具有两亲性,如 α -螺旋和 β -折叠。在此模型中 CATHs 相互识别并聚集在细菌细胞膜表面,亲水区域与磷脂头基相互吸引,疏水区域与细胞膜的疏水核心相互作用,最终在膜上形成孔洞,引起细菌死亡^[13]。

除了对细胞膜的破坏作用,一些 CATHs 可以通过干扰细菌的正常生理功能来发挥抗菌作用,例如:阻断 DNA 合成、影响 RNA 转录、干扰蛋白的加工折叠以及阻断能量供应和营养物质吸收等^[14]。而传统抗生素大多数是通过与微生物的酶发生作用,干扰其正常的生命活动,需要较长时间才能发挥作用。因而 CATHs 作为新药模板或新型抗生素替代品的优势是:1) 抗菌谱广,对 G⁺菌、G⁻菌、真菌、霉菌、原虫和部分有包膜病毒均有活性。2) 抗菌活性强,最小抑菌浓度 (MIC) 可以达到 nmol/L 水平,且杀菌作用迅速。3) 不易诱导微生物产生耐药性,对大量临床耐药菌株,甚至是超级耐药菌,具有非常强的活性^[15-16]。4) 低溶血性及细胞毒性^[17-18]。5) 相对于溶菌酶和防御素等蛋白类抗生素,分子量小,不含有二硫键,结构简单。6) 生产工艺简单,成本低。7) 除了直接的抑菌杀菌活性外,还具有多种免疫调节活性^[19-20]。

3 Cathelicidins 的结构改造与策略

虽然 CATHs 家族活性肽具有以上的优势,但某些特点仍然限制了其广泛应用。由结构特点所致的强抗菌活性通常伴随着较强的溶血活性;且蛋白

的稳定性低,容易被蛋白酶水解等。因此针对该家族肽的结构改造一直是相关领域研究热点。

3.1 提高 CATHs 生物活性的改造

3.1.1 氨基酸替换法

替换天然 CATHs 某些特定的氨基酸残基是增强其抗菌活性的重要手段。早在 2005 年 Hilpert 等发现将具有典型的 α -螺旋结构牛 CATH-Bac2A 的第 3 位 Ala 替换为 Trp,得到的 W3 抗菌活性提高了 6-8 倍^[21]。随后 Zhu 等在对猪 CATH、PMAP-36 的研究中,先截取 PMAP-36 的 α 螺旋区域得到 RI16,然后用 Trp 替换成对存在的带正电荷的 AA (Lys 和 Arg) 分别得到 PRW3、PRW4、PRW5 和 PRW6,抗菌活性提高了 8-16 倍^[22],原因可能为 RI16 含有较多的 Lys 和 Arg,而 Trp 的侧链为被带负电荷 π 电子云环绕的吲哚基,吲哚基的存在有助于使得带正电荷的基团渗入到细胞膜的双分子层中,进而使疏水面更深地插入到细菌细胞膜中破坏其完整性。Concetta 等用疏水性较强的 Ala 替代欧洲林蛙来源的 Temporin-B 中疏水较弱的 Gly,得到的衍生物对 G⁺菌的抗菌活性明显增强;把来自黑龙江林蛙的 Temporin-1Ceb α -螺旋的亲水面 5-6 个非极性氨基酸替换为 Lys,改造体抗菌活性提高了 10-40 倍^[23],原因可能是提高了抗菌肽的阳离子性和两亲性。

3.1.2 片段拼接法

将 CATHs 活性区域与同家族或者其他活性肽的活性区域直接进行拼接也是提高 CATHs 抗菌活性、或引入其他性能的常见手段。鉴于 CATHs 结构与功能关系,常利用截短改造的方法可得到其活性区域。PMAP-36 由 36 个 AA 组成,Lv 等舍去 C 端 12 个 AA 仅保留 N 端 24 个 AA,其截短产物 GI24 的抗菌活性与 PMAP-36

活性一致^[24]。人 LL-37 的只含 19 个 AA 的截短产物 IG-19 仍然具有很强的抗菌活性^[25]。对鸡的 cathelicidin-2 (CATH-2) 进行截短改造, 仅保留 C11-21, 仍然有很好的抗菌活性^[26]。

将 2 个以上活性截断体拼接后往往会得到具有所有截短体活性特征的拼接体。将 LL-37 α 螺旋区分别与 magainin II、magainin II (alaninated) 和 cecropin A 的活性区域进行拼接分别得到 MALL、LLaMA 和 CaLL。其中 LLaMA 和 CaLL 具有很好的抗菌活性, 尤其是 CaLL 的活性更加突出^[27]。Ma 等将猪源 PMAP-36 的改造产物 PRW-4 与鸡 fowlicidin-2 的 α 螺旋区域进行拼接得到 PR-FO; 将 PRW-4 与 protegrin-3 的 β 折叠区域进行重组得到 PR-PG; 将 PRW-4 与 tritrtpticin 的活性区域结合得到 PR-TR, 与模板肽相比这 3 条重组肽的抗菌活性尤其是对耐药菌的活性, 得到了明显提升。其中 PR-FO 活性最好, 抗菌活性提高了近 13 倍^[28]。我们将海蛇 Hc-CATH 活性区域 Hc3 截断后与 trypsin inhibitor loop、ORB-C 双向拼接, 再通过关键残基替换, 得到 4 个改造体, 与 Hc3 相比, 不仅保留了强抗菌抗炎活性, 低溶血低毒性, 更极大提高了对理化条件 (NaCl、pH 和血清等) 及蛋白酶的稳定性。

3.1.3 化学修饰法

对天然 CATHs 进行化学修饰也是增强其抗菌活性的常见手段。LL-37 的改造体, 17F2 (GX₁KRLVQRLKDX₂LRNLV, X₁X₂ 均为 Phe, Leu 为 D 型氨基酸), 在模拟膜环境中的高级结构为非典型的两亲结构, 无粘聚力的侧链, 造成了其结构上的疏水缺陷。通过引入更大的疏水化学基团的填充 17F2 的疏水凹槽, 以增强其抗菌活性。4-三氟甲基苯基丙氨酸

(4-tri fluoromethyl phenyl alanine)、2-萘基丙氨酸 (2-naphthylalanine) 和联苯基丙氨酸 (Biphenylalanine) 均为氨基酸类似物, 也可以看作 Ala 的侧链经疏水基团修饰的产物。在检测的 6 株菌株中, 无修饰的 17F2 仅对 3 株表现出抗菌活性, 而修饰的改造体对 6 株菌均有抗菌活性且抗菌活性得到很大提升, 其中 17BIPHE2 活性最好。后续研究中还发现 17F2 和 6 种化学修饰改造体除了通过破坏细菌细胞膜完整性从而发挥其抗菌活性, 还能够进入细胞与 DNA 结合, 并且抗菌活性与 DNA 结合能力呈正相关^[29]。因而推测化学修饰增强活性的原因可能是提高了 CATHs 的两亲性和 DNA 结合能力。

3.1.4 二聚体的构建

一些含有 Cys 的抗菌肽能够形成由二硫键连接的二聚体, 使得生物活性明显提高。此种手段也可应用于含有 Cys 的 CATHs 的优化改造。实验表明二聚化的 LLP1、Analogue 5、magG3C 和 TL1 的抗菌活性均得到明显提升, 最高提升了 16 倍^[30]。同时还发现 LLP1 的单体和二聚体形式的二级结构均为 α -螺旋, 说明二硫键不会改变多肽原有的二级结构。二聚化也可能提高抗菌肽的其他一些生物活性, 比如 PST13-RK (一类 β -转角抗菌肽) 经二聚化修饰后, 其抗癌活性明显提高^[31]。

3.1.5 轭合物的构建

该类 CATHs 的组成模式为 :CATH-连接体-功能域, 其中 CATHs 行使杀灭微生物的功能, 功能域能够识别特定的微生物, 连接体将二者连接。连接体区域通常形成绞链区, 功能域为非线性肽或者非肽类分子。SMAP-28 是来自绵羊的 α -螺旋 CATH, 用马来酰亚胺作为连接体将其与牙龈卟啉单胞菌 *Porphyromonas gingivalis*

菌株表面特异性抗体 IgG 进行连接可形成一种轭合物,这种改造体在低浓度条件下 (20 $\mu\text{g/mL}$) 可选择性杀灭 *P. gingivalis*, 而对伴放线放线杆菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 和微小消化链球菌 *Peptostreptococcus micros* 不表现出抗菌活性,但在高浓度条件下 (50 $\mu\text{g/mL}$), 对 3 种试验菌均表现出杀灭活性^[32]。

将功能域换为靶向体,将得到另一类轭合物: CATHs-连接体-靶向体。靶向体是一类能够识别特定病原菌的区域,与功能域不同的是该区域为线性肽。与之类似的是特异性靶向抗菌肽 (Specifically targeted antimicrobial peptides, STAMPs)^[33], 这种构建方式将致病菌信息素末端的氨基酸序列整合到抗菌肽上,使整个分子可以被信息素感受器识别,从而更加有效地破坏特定微生物的细胞膜,将其杀灭^[34]。该类 CATHs 在多种细菌共栖的环境中,可以选择性地杀灭有害微生物,在维持动物肠道健康方面有着得天独厚的优势。

富含 Lys 的抗菌肽与抗生素新霉素 B 可形成轭合物,也可应用于对 CATHs 的改造研究中。Bera 对该轭合物的杀菌活性研究结果表明,其对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 的活性较肽和新霉素相比提高了 8 倍,但杀灭其他革兰氏阳性菌的活性却有所下降,同时对革兰氏阴性菌的活性提升较为明显,与新霉素和肽相比分别提升了 4–8 倍和 12 倍^[35]。

将脂肪酸与抗菌肽相连也可增强抗菌活性。脂肪酸链的长度不超过 16 个时,其抗菌活性与脂肪酸链碳原子数呈正相关^[36],机制可能为脂肪酸链增加了肽的疏水性,从而加强了其与膜的亲和性进一步提高了抗菌活性。

将 CATHs 作为佐剂,与抗原形成的轭合物,

还能够提高机体的免疫反应。将编码 LL-37 的基因与编码巨噬细胞集落刺激因子受体 (M-CSFR_{J6-1}) 的基因进行融合表达,表达得到的轭合物能够高效诱导免疫反应,刺激脾脏细胞分泌 IFN- γ 和 IL-4, 并且能够延长接种 P2/O-CSFR_{J6-1} 肿瘤细胞小鼠的寿命^[37]。

3.2 提高 CATHs 细胞选择性的改造

3.2.1 点突变

猪 Titrpticin 富含 Arg 和 Trp, 具有很强的抗菌活性,但是溶血性较高,对真核细胞的杀伤作用成为阻碍其临床应用的障碍之一。将 Titrpticin 的所有 Arg 替换为 Lys 得到 TRK, 虽然抗菌活性仅略微提升,但溶血活性降低近 40 倍^[38]。羊 Ovispirin-1 是 SMAP-29 的前体,具有很强的抗菌活性但同时也具有很强的上皮细胞毒性,人红细胞溶血性。在保留 Ovispirin-1 两亲性的基础上,用弱疏水的 Gly 取代第 10 位强疏水的 Ile,得到 Ovispirin G-10,保留其抗菌活性的基础上,溶血活性降至仅 2.5%,同时对子宫细胞 ME-80 和肺癌细胞 A-549 的细胞毒性也极大降低,原因是降低了强疏水氨基酸的比例^[39]。

3.2.2 破坏 Leu 和 Phe 拉链结构

牛 BMAP-27 具有广谱的抗菌活性和中度溶血活性。其二级结构为 α -螺旋, N-端含有较多的 Leu, C-端含有较多的 Phe, 分别位于 a 位点和 d 位点, 几乎在 α -螺旋的一侧排列, 因而在 N-端和 C-端分别形成 Leu 拉链和 Phe 拉链结构, 该结构与溶血活性密切相关。将位于 a 位点和 d 位点的 Phe 和 Leu 用 Ala 替代, 可以破坏拉链结构得到 4 条改造体, 对人血红细胞的溶血活性几乎消失, 而原始肽在浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 条件下溶血率在 20% 以上^[40]。研究还发现改造体对鼠的 3T3 细胞的细胞毒也明显低于原始肽。

3.3 提高 CATHs 稳定性

作为蛋白多肽类药物, CATHs 也面临被环境中、动物体内的蛋白酶家族水解的难题。如何提高其酶稳定性是蛋白类药物应用亟待解决的首要难题^[41]。

3.3.1 D-型氨基酸替换 L-型氨基酸

将 GF-17 (LL-37 的 C17-32 片段) 的 20、24 和 28 位 AA 替换为 D-型氨基酸, 得到的 GF-17d3, 在与糜蛋白酶共孵育后仍具有抗菌活性。说明 GF-17d 在存在糜蛋白酶的环境中有较好的稳定性。但若只替换第 20 位氨基酸或者第 20、24 位的 L-型 Ile 为 D-Ile, 则对糜蛋白酶的稳定性没有明显的改变^[42]。在本次研究中虽然用 D-型氨基酸替换相应的 L-型氨基酸可以提高 CATHs 的稳定性, 但其抗菌活性却不如原始肽。Mathison 等研究者发现将鼠 FEG 的所有氨基酸残基由 L-型转变为 D-型后, 抗蛋白酶解能力显著提升, 并且 D-型肽在含有 NaCl、MgCl₂ 和血清的环境中抗菌活性高于 L-型^[43-44]。

3.3.2 环形 CATHs 的构建

将多肽的骨架进行环化是一种有效的增强稳定性的手段。一般分为两种, 一种是共价键连接 N-端的-NH₃ 和 C-末端的-COOH; 另一种是 N-端 Cys 和 C-端 Cys 的-SH 形成二硫键。将富含 Arg 和 Trp 的短肽进行环化, 发现其酰胺键环化类似物在酶中的稳定性显著提高^[45]。

3.3.3 构建模拟型 CATHs

CATHs 的抗菌活性与其理化性质及高级结构密切相关, 通过模拟其高级结构有望构建在体内体外环境中较为稳定的模拟型 CATHs。目前已被成功模拟的二级结构主要有: α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和 loop 等^[46]。其次, 采用寡酰基赖氨酸和类固醇-胺共价物低聚体(Oligoacyllysines, OAKs)

来模拟 CATHs 的两亲性和正电荷性, 并且寡酰基赖氨酸的疏水性可以通过调控酰基链的长度实现^[47]。由此该类化合物既能发挥抗菌性能, 同时又具有抗蛋白酶降解、耐酸等优点^[48]。

3.3.4 构建固位型 CATHs

通过化学或物理方法将 CATHs 固定在载体上, 形成固位型 CATHs, 可使稳定性显著增强, 如固位型 LL-37^[49]。固位后 CATHs 的二级结构、间隔区、密度、活性序列、易变性、固定链位置和周围环境都会影响其生物学效价^[50]。但研究表明间隔区的长短、固定链的位置及 N 端的疏水性残基比表面密度对于抗菌活性而言更加重要。

4 展望

CATHs 作为优秀的抗感染抗炎症新药模板, 近年来对其进行的分子改造已成为热点, 目的均是最大限度地提升其药理学活性, 降低毒副作用及解决蛋白类药物所特有的稳定性差的问题。目前围绕 CATHs 的结构、带正电荷以及疏水性 AA 的数量及位置, 对 CATHs 进行功能改造, 如残基替换、构建杂合肽、截取天然抗菌肽的部分序列以及增加肽链的正电荷含量等手段均取得了较大进展, 已有一些优势改造体除药理活性明显提升外, 成药性也得到显著加强, 已进入临床研究。随着结构生物学的发展, 更多 CATHs 的三维结构可被精确模拟, 在此基础上的结构和功能关系以及分子设计将得以更加定性定量的发展。

REFERENCES

- [1] Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. Nat

- Rev Microbiol, 2012, 10(4): 266–278.
- [2] Theuretzbacher U. Future antibiotics scenarios: is the tide starting to turn. Int J Antimicrob Agents, 2009, 34(1): 15–20.
- [3] Vilhena C, Bettencourt A. Daptomycin: a review of properties, clinical use, drug delivery and resistance. Mini Rev Med Chem, 2012, 12(3): 202–209.
- [4] Groenink J, Walgreen-Weterings E, van 't Hof W, et al. Cationic amphipathic peptides, derived from bovine and human lactoferrins, with antimicrobial activity against oral pathogens. FEMS Microbiol Lett, 1999, 179(2): 217–222.
- [5] Ramanathan B, Davis EG, Ross CR, et al. Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. Microbes Infect, 2002, 4(3): 361–372.
- [6] Agerberth B, Gunne H, Odeberg J, et al. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(1): 195–199.
- [7] Tossi A, Scocchi M, Zanetti M, et al. PMAP-37, a novel antibacterial peptide from pig myeloid cells. cDNA cloning, chemical synthesis and activity. Eur J Biochem, 1995, 228(3): 941–946.
- [8] Veldhuizen EJ, Schneider VA, Agustindari H, et al. Antimicrobial and immunomodulatory activities of PR-39 derived peptides. PLoS ONE, 2014, 9(4): e95939.
- [9] Ando S, Mitsuyasu K, Soeda Y, et al. Structure-activity relationship of indolicidin, a Trp-rich antibacterial peptide. J Pept Sci, 2010, 16(4): 171–177.
- [10] Storici P, Del Sal G, Schneider C, et al. cDNA sequence analysis of an antibiotic dodecapeptide from neutrophils. FEBS Lett, 1992, 314(2): 187–190.
- [11] Glukhov E, Stark M, Burrows LL, et al. Basis for selectivity of cationic antimicrobial peptides for bacterial *versus* mammalian membranes. J Biol Chem, 2005, 280(40): 33960–33967.
- [12] Strahilevitz J, Mor A, Nicolas P, et al. Spectrum of antimicrobial activity and assembly of dermaseptin-b and its precursor form in phospholipid membranes. Biochemistry, 1994, 33(36): 10951–10960.
- [13] Hancock RE, Scott MG. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(16): 8856–8861.
- [14] Lan Y, Ye Y, Kozłowska J, et al. Structural contributions to the intracellular targeting strategies of antimicrobial peptides. Biochim Biophys Acta, 2010, 1798(10): 1934–1943.
- [15] Li JX, Xu XQ, Xu CH, et al. Anti-infection peptidomics of amphibian skin. Mol Cell Proteomics, 2007, 6(5): 882–894.
- [16] Giacometti A, Cirioni O, Del Prete MS, et al. *In vitro* effect on *Cryptosporidium parvum* of short-term exposure to cathelicidin peptides. J Antimicrob Chemother, 2003, 51(4): 843–847.
- [17] Tripathi S, Verma A, Kim EJ, et al. LL-37 modulates human neutrophil responses to influenza a virus. J Leukocyte Biol, 2014, 96(5): 931–938.
- [18] Rapala-Kozik M, Bochenska O, Zawrotniak M, et al. Inactivation of the antifungal and immunomodulatory properties of human cathelicidin LL-37 by aspartic proteases produced by the pathogenic yeast *Candida albicans*. Infect Immun, 2015, 83(6): 2518–2530.
- [19] Yu HN, Lu YL, Qiao X, et al. Novel cathelicidins from pigeon highlights evolutionary convergence in avian cathelicidins and functions in modulation of innate immunity. Sci Rep, 2015, 5: 11082.
- [20] Zhang HW, Xia X, Han FF, et al. Cathelicidin-BF, a novel antimicrobial peptide from *Bungarus fasciatus*, attenuates disease in a dextran sulfate sodium model of colitis. Mol Pharm, 2015, 12(6): 1648–1661.
- [21] Hilpert K, Volkmer-Engert R, Walter T, et al. High-throughput generation of small antibacterial peptides with improved activity. Nat Biotechnol, 2005, 23(8): 1008–1012.
- [22] Zhu X, Dong N, Wang ZY, et al. Design of imperfectly amphipathic α -helical antimicrobial peptides with enhanced cell selectivity. Acta Biomater, 2014, 10(1): 244–257.
- [23] Shang DJ, Li XF, Sun Y, et al. Design of potent,

- non-toxic antimicrobial agents based upon the structure of the frog skin peptide, temporin-1CEb from Chinese brown frog, *Rana chensinensis*. Chem Biol Drug Des, 2012, 79(5): 653–662.
- [24] Lv Y, Wang JJ, Gao H, et al. Antimicrobial properties and membrane-active mechanism of a potential α -helical antimicrobial derived from cathelicidin PMAP-36. PLoS ONE, 2014, 9(1): e86364.
- [25] Nan YH, Bang JK, Jacob B, et al. Prokaryotic selectivity and LPS-neutralizing activity of short antimicrobial peptides designed from the human antimicrobial peptide LL-37. Peptides, 2012, 35(2): 239–247.
- [26] van Dijk A, van Eldik M, Veldhuizen EJ, et al. Immunomodulatory and anti-inflammatory activities of chicken cathelicidin-2 derived peptides. PLoS ONE, 2016, 11(2): e0147919.
- [27] Fox MA, Thwaite JE, Ulaeto DO, et al. Design and characterization of novel hybrid antimicrobial peptides based on cecropin A, LL-37 and magainin II. Peptides, 2012, 33(2): 197–205.
- [28] Ma Z, Wei DD, Yan P, et al. Characterization of cell selectivity, physiological stability and endotoxin neutralization capabilities of α -helix-based peptide amphiphiles. Biomaterials, 2015, 52: 517–530.
- [29] Wang GS, Hanke ML, Mishra B, et al. Transformation of human cathelicidin LL-37 into selective, stable, and potent antimicrobial compounds. ACS Chem Biol, 2014, 9(9): 1997–2002.
- [30] Tencza SB, Creighton DJ, Yuan T, et al. Lentivirus-derived antimicrobial peptides: increased potency by sequence engineering and dimerization. J Antimicrob Chemother, 1999, 44(1): 33–41.
- [31] Yang ST, Kim JI, Shin SY. Effect of dimerization of a β -turn antimicrobial peptide, PST13-RK, on antimicrobial activity and mammalian cell toxicity. Biotechnol Lett, 2009, 31(2): 233–237.
- [32] Franzman MR, Burnell KK, Dehkordi-Vakil FH, et al. Targeted antimicrobial activity of a specific IgG-SMAP28 conjugate against *Porphyromonas gingivalis* in a mixed culture. Int J Antimicrob Agents, 2009, 33(1): 14–20.
- [33] He J, Anderson MH, Shi WY, et al. Design and activity of a ‘dual-targeted’ antimicrobial peptide. Int J Antimicrob Agents, 2009, 33(6): 532–537.
- [34] Eckert R, He J, Yarbrough DK, et al. Targeted killing of *Streptococcus mutans* by a pheromone-guided “smart” antimicrobial peptide. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(11): 3651–3657.
- [35] Bera S, Zhanel GG, Schweizer F. Synthesis and antibacterial activity of amphiphilic lysine-ligated neomycin B conjugates. Carbohydr Res, 2011, 346(5): 560–568.
- [36] Chu-Kung AF, Nguyen R, Bozzelli KN, et al. Chain length dependence of antimicrobial peptide-fatty acid conjugate activity. J Colloid Interface Sci, 2010, 345(2): 160–167.
- [37] An LL, Yang YH, Ma XT, et al. LL-37 enhances adaptive antitumor immune response in a murine model when genetically fused with M-CSFR_{J6-1} DNA vaccine. Leukemia Res, 2005, 29(5): 535–543.
- [38] Yang ST, Shin SY, Lee CW, et al. Selective cytotoxicity following Arg-to-Lys substitution in tritrypticin adopting a unique amphipathic turn structure. FEBS Lett, 2003, 540(1/3): 229–233.
- [39] Sawai MV, Waring AJ, Kearney WR, et al. Impact of single-residue mutations on the structure and function of ovispurin/novispurin antimicrobial peptides. Protein Eng, 2002, 15(3): 225–232.
- [40] Ahmad A, Azmi S, Srivastava RM, et al. Design of nontoxic analogues of cathelicidin-derived bovine antimicrobial peptide BMAP-27: the role of leucine as well as phenylalanine zipper sequences in determining its toxicity. Biochemistry, 2009, 48(46): 10905–10917.
- [41] Moncla BJ, Pryke K, Rohan LC, et al. Degradation of naturally occurring and engineered antimicrobial peptides by proteases. Adv Biosci Biotechnol, 2011, 2(6): 404–408.
- [42] Wang GS, Mishra B, Epan RF, et al. High-quality 3D structures shine light on antibacterial, anti-biofilm and anti-viral activities of human cathelicidin LL-37 and its fragments. Biochim Biophys Acta, 2014, 1838(9): 2160–2172.

- [43] Mathison RD, Davison JS, Befus AD, et al. Salivary gland derived peptides as a new class of anti-inflammatory agents: review of preclinical pharmacology of C-terminal peptides of SMR1 protein. *J Inflamm*, 2010, 7(1): 49.
- [44] Huang JF, Hao DM, Chen Y, et al. Inhibitory effects and mechanisms of physiological conditions on the activity of enantiomeric forms of an α -helical antibacterial peptide against bacteria. *Peptides*, 2011, 32(7): 1488–1495.
- [45] Nguyen LT, Chau JK, Perry NA, et al. Serum stabilities of short tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptide analogs. *PLoS ONE*, 2010, 5(9): e12684.
- [46] Robinson JA. Protein epitope mimetics as anti-infectives. *Curr Opin Chem Biol*, 2011, 15(3): 379–386.
- [47] Findlay B, Zhanel GG, Schweizer F. Cationic amphiphiles, a new generation of antimicrobials inspired by the natural antimicrobial peptide scaffold. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(10): 4049–4058.
- [48] Giuliani A, Rinaldi AC. Beyond natural antimicrobial peptides: multimeric peptides and other peptidomimetic approaches. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(13): 2255–2266.
- [49] Izquierdo-Barba I, Vallet-Regí M, Kupferschmidt N, et al. Incorporation of antimicrobial compounds in mesoporous silica film monolith. *Biomaterials*, 2009, 30(29): 5729–5736.
- [50] Costa F, Carvalho IF, Montelaro RC, et al. Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta Biomater*, 2011, 7(4): 1431–1440.

(本文责编 陈宏宇)