

抗菌肽的抗菌机制及其临床应用

侯晓姝 胡宗利 陈国平* 李勇 王炳琴 李栀恩

(重庆大学生物工程学院 重庆 400030)

摘要: 抗菌肽是广泛存在于生物体内的一种小分子肽, 具有广谱性、高效性、稳定性等特点, 其本身不易产生耐药性。不仅具有杀菌作用, 还能抑杀真菌、寄生虫、病毒以及肿瘤细胞且对正常细胞毒性较小。新颖抗生素发现的缺乏, 导致了大量耐药菌株的出现, 抗菌肽有可能成为一种新的抗生素替代品。本文介绍了抗菌肽的结构特点、生物活性, 并重点阐述了其抗菌机制及最新临床应用进展。

关键词: 抗菌肽, 抗菌机制, 临床应用

Antimicrobial Peptides: Antibacterial Mechanism and Therapeutic Use

HOU Xiao-Shu HU Zong-Li CHEN Guo-Ping* LI Yong WANG Bing-Qin LI Zhi-En

(Bioengineering College of ChongQing University, Chongqing 400030, China)

Abstract: Antimicrobial peptides, a cluster of small peptides secreted by the majority of creatures, have been demonstrated with activity against a wide range of microorganisms including bacteria, protozoa, yeast, fungi, viruses and even tumor cells. These peptides have some features such as broad spectrum, high efficacy and stability, little drug resistance. A lack of new antibiotics combined with emerging multi-drug resistance issues demands that new antimicrobial strategies be explored for treating these infections. It has been proposed that the antimicrobial peptides might form the foundation for a new class of clinically useful antimicrobials. We review the advantages of these molecules in construction features and bioactivity, with the focus on the mechanism and clinical applications.

Keywords: Antibacterial peptides, Mechanism of antibiosis, Clinical application

近年来, 在临床治疗中结构新颖的抗生素发现匮乏, 在过去的四十几年中仅有 3 类新的抗生素出现, lipopeptides, oxazolidinones 和 streptogramins, 且这几种均针对革兰氏阳性细菌^[1]。新的治疗革兰氏阴性菌抗生素的缺乏导致抗药菌群迅猛发展, 使某些感染性疾病成为临床治疗的难题, 因此新的抗菌策略问题急待解决。抗菌肽(Antibacterial peptides)

是天然免疫的主要成分, 具有广谱性、高效性、选择毒性、稳定性及不易产生抗药性等特点, 自发现和至今被认为是现有抗生素的最佳替代品, 其研究及应用已成为生物制药领域中的热点。目前不同类型的抗菌肽已从各种生物包括细菌、真菌、植物、昆虫、两栖类动物、鱼类、鸟类、哺乳类动物和人体中分离出来并得到鉴定。抗菌肽代表了一种

新的抗生素替代品,引起了广泛的研究兴趣,有望成为治疗耐药性抗药细菌的一个方法。本文结合近年来国内外的研究报道,介绍了抗菌肽的结构特点、生物活性并重点阐述了其抗菌机制及临床应用情况。

1 抗菌肽结构特点与生物活性

抗菌肽一般由小于 100 个氨基酸残基组成,存在很多赖氨酸、精氨酸及大于 30%的疏水性氨基酸,大多带有一定的正电荷。抗菌肽的家族成员十分庞大,目前已经有超过 900 种的抗菌肽被从各种生物中分离鉴定出来。由抗菌肽的二级结构可以将其分为 4 种类别:(1)带有 α 螺旋结构的线性肽如 cecropin A^[2]、magainin^[3];(2) β 折叠肽如植物防御素 γ -2-purothionin^[4]、hepcidin^[5];(3)具有环形结构的肽如 subtilisin A^[6];(4)线形肽,该类型抗菌肽通常带有一个或多个占主导地位的氨基酸,如从牛的嗜中性细胞里分离出来的 indolicidin 由 13 个氨基酸残基组成,其中就含有 5 个色氨酸^[7]。前 2 种类型是自然中最常见的抗菌肽类型。还有一些肽并不具有以上单一的结构或者结构较为新颖,人类 β defensin 2 既具有 α 螺旋也有 β 折叠结构^[8]。从海洋两栖动物中以螃蟹为食的蛙 *Rana cancrivora* 皮肤中首次分离得到一种抗菌肽 cancrin,氨基酸序列为 GSAQPYKQLHKVVNWDPYG,分析发现其一级结构与已有的抗菌肽无相似性,不能简单将其划分为以上的任何一类抗菌肽^[9]。除了天然存在的抗菌肽之外,还存在着许多人工合成的抗菌肽异构体,现在已经有许多专门收录各种抗菌肽的数据库,如 APD 数据库: <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>, ANTIMIC 数据库: <http://research.i2r.a-star.edu.sg/Templar/DB/ANTIMIC/>。

抗菌肽的活性与许多因素有关,包括抗菌肽的大小、序列、电荷、结构和构象、疏水性及双亲性等,其生物功能可以分为几个方面:1)直接杀菌作用:抗菌肽除了能杀灭革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌外,对病毒、寄生虫、真菌也具有活性。2)免疫系统调节物:最近许多研究认为在生理性环境里,在先天免疫细胞(嗜中性粒细胞及上皮细胞)和连接先天免疫及获得性免疫的细胞(单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞)中,抗菌肽激发了一系列与炎症、先天免疫及获得性免疫有关的生物效应。哺乳动物

defensins 可以增强或抑制细胞内功能如趋化性、编程性细胞死亡、基因转录以及细胞因子生产等^[10]。

3) 免疫激活:感染或损伤处所分泌的 Cathelicidins 和 defensins 对效应细胞具有趋化性,诱导化学激活素的转录及分泌和肥大细胞的组胺释放,这些反应一起则能促进先天的及获得性免疫细胞的补充^[11]。4) 炎症及免疫抑制:哺乳动物抗菌肽除了具有促炎性反应外,也能阻止有害的炎症应答。Cathelicidins 能够抑制致炎细胞因子如 TNF- α 和 IL-6 的相关基因转录、促炎症反应物质的释放及避免细菌感染后啮齿类的脓毒症,还能防止引起阻止损伤和炎症的毒性组分的产生,如 PR-39 抑制活性氧簇的生成。5) 免疫增强:抗菌肽可以通过调节树突状细胞的功能和抗原特异性免疫应答而作用于先天及获得性免疫界面^[12]。LL-37 能够诱导初期的单核细胞衍生的树突状细胞的分化,增加细胞内吞能力,调节吞噬细胞受体的表达和功能,同时上调 CD86 的表达及增加 Th1 细胞因子的分泌作用^[13]。

2 抗菌肽抗菌机制

抗菌肽能够选择性抑制细菌生长并杀死细菌,细菌细胞膜脂质富含像磷脂酰甘油、心肌磷脂或丝氨酸磷脂之类的磷脂首基而带有负电荷。与之相反,哺乳动物细胞膜则主要由两性离子磷脂如脑磷脂、磷酸卵磷脂、鞘磷脂等组成,此外哺乳动物细胞膜中还有一个重要的成分胆固醇,可以与抗菌肽相结合并降低其活性,因此细胞膜成分的不同是抗菌肽选择性杀伤细菌的一个主要因素^[14]。

目前多数研究者主要用磷脂膜模型体系来研究抗菌肽与细胞膜的相互作用,也有些研究者利用膜潜在的敏感染料和荧光标记肽段来研究抗菌肽与细胞的相互作用^[15]。关于抗菌肽的抗菌机制目前还没有在研究者中达成一致意见,根据现有的研究报道,可以大致将其分为 4 个阶段(如图 1 所示):1) 抗菌肽与细胞膜的初级接触阶段,2) 抗菌肽浓度及构象变化阶段,3) 膜透化阶段,4) 细胞死亡阶段。

2.1 抗菌肽与细胞膜初期接触

关于抗菌肽与细胞膜的初期相互作用目前主要存在两种说法,分别是静电相互作用及受体介导的相互作用。抗菌肽通过静电作用与微生物细胞膜结合早已被普遍认可,以革兰氏阴性细菌为例,1997 年 Hancock 提出抗菌肽与细胞膜最初结合时,与

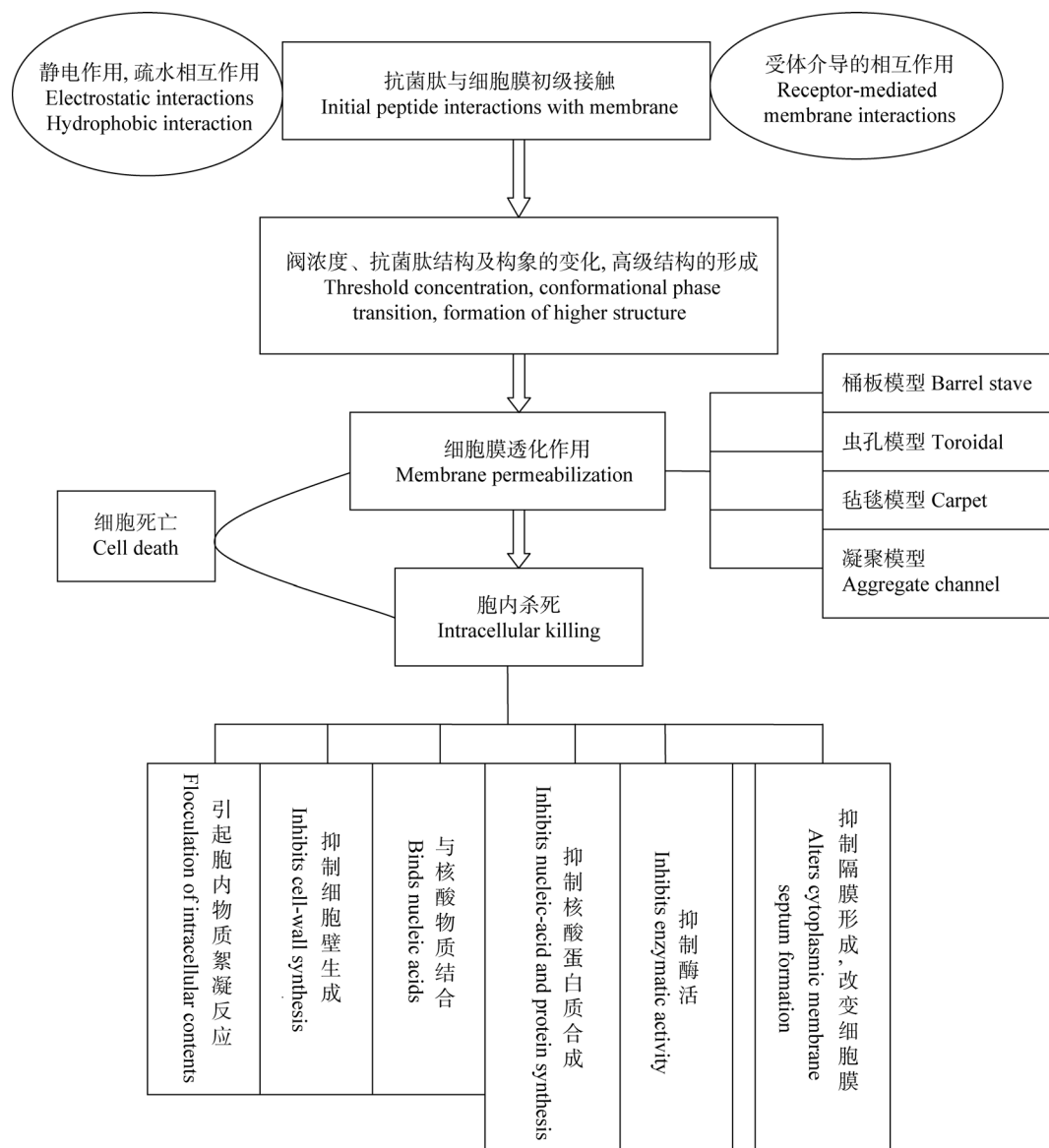


图1 抗菌肽抗菌机制图

Fig. 1 The antibacterial mechanism of antimicrobial peptides

LPS 结合的二价阳离子被抗菌肽竞争性代替, 且抗菌肽与 LPS 的结合能力比阳离子 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的结合能力高出 3 个数量级^[16]。革兰氏阳性细菌缺乏细胞外膜或者 LPS, 不过其细胞被膜上含有丰富的带负电荷的磷壁酸和糖醛酸磷壁酸。 *Staphylococcus aureus* 含有一种未知的抗菌肽抗性机制, 对防御素不敏感, Peschel A 等人研究发现其抗性与基因 *mprF* 密切相关, *mprF* 控制 L-赖氨酸修饰磷脂酰甘油的过程导致膜表面负电荷的降低, 而 *mprF* 缺失的突变株对抗菌肽的敏感性增加^[17]。尽管关于抗菌肽与细胞膜的静电相互作用在研究者中已达到共识,

但越来越多的研究也表明, 少数抗菌肽是通过受体介导与细胞膜相结合, 其中研究最多的是 Nisin。Nisin 能够与细胞壁合成的基本前体 Lipid 特异性结合, 促使革兰氏阳性细菌膜上形成孔洞从而对细菌有很强的杀伤性。通过高分辨核磁共振分光检定法(High resolution NMR)研究 nisin 和 Lipid 在 SDS 胶束中的相互作用, 结果认为 nisin 的 N 端首先结合到 Lipid 上, 发生结构重排, 而 nisin 的 C 端则激活孔洞形成^[18]。另外发现不是所用的天然的 L 型抗菌肽与其 D 型异构体都具有同样的活性^[19], 因此受体介导的相互作用对某些抗菌肽与微生物表面

的结合及随后的杀伤活性十分重要。

2.2 抗菌肽与膜结合之后的主要变化

抗菌肽与细胞膜表面结合之后,进入第2个作用阶段,可称之为阈浓度阶段。这个阶段首先包括了抗菌肽在细胞膜表面的积累,影响阈浓度的参数很多,如抗菌肽浓度、自我聚集的倾向和磷脂膜的组成成分、流动性、首基的大小等^[20]。可能影响阈浓度的另外一个重要因素是许多细菌细胞膜的膜电位($\Delta\psi$),人们推测 $\Delta\psi$ 牵动着阳离子肽泳向非极性细胞膜环境,并有效地降低了孔洞形成的能量障碍。一些抗菌肽的活性依赖于相当量的 $\Delta\psi$ 如 nisin,当其 N 端的赖氨酸被亮氨酸取代之后, nisin 丧失其电压依赖性^[21]。

抗菌肽与细胞膜结合之后发生结构或构象的转变, α 螺旋肽很好地证明了这个说法。研究证明, α 螺旋抗菌肽在水溶液环境中呈无规则构象,然而与磷脂双层相结合后则迅速形成严格的两亲性 α 螺旋构象。有趣的是,一些抗菌肽只有与负电荷双分子层结合时才能完成构象的转变,如蛙皮肽 PGLa 与由磷酸卵磷脂和鞘磷脂组成的膜结合时,显示无规则构象,只有与由磷脂酰甘油和脑磷脂组成的膜作用时,形成 α 螺旋构象^[22]。另有研究认为抗菌肽与细胞膜结合之后,抗菌肽之间或抗菌肽与脂质会相互作用,可能会形成络合物结构,不过抗菌肽形成四级结构的潜力与其自身单体的组成及构象有根本关系^[14]。

2.3 膜透化机制

关于膜透化作用已经提出了许多机制,由于微生物超微结构的差异性,同种抗菌肽可能通过不同的抗菌机制作用于不同微生物。抗菌肽也可能用不同的机制杀死同一个物种,这决定于一些因素如生长状态、组织位置、其他免疫机制的存在或缺乏等等。以下讨论的4种机制是目前根据大量的研究得出的理论,要指出的是,在这个领域的研究者们目前还没有达到完全的意见一致。

1) “桶板”模型:数量相对较少的阳离子抗菌肽在电荷的作用下,结合在细胞膜表面并相互聚合,肽分子中的疏水面向外朝向细胞膜的酰基链,而亲水面形成孔或槽,形成横跨细胞膜的离子通道。离子通道一旦形成,外界的水分即可渗入细胞内部,细胞质也可渗透到外部。由于失去能量,严重时细胞膜即会崩解而导致细胞死亡^[21]。形成跨膜的抗菌

肽至少是有22个氨基酸的 α 螺旋结构的肽,或者是有8个氨基酸的具有 β 折叠构象的肽^[23]。这个模型已经提出超过10年了,不过几乎还没有一个十分确切的证据来证明此机制。

2) “环形孔”(虫孔)模型:“虫孔”模型首先由 Hara T 等人在研究 α 螺旋肽 maffainins 和 PGLa 时提出来,最近有很多研究支持该模型,其与“桶板”模型最主要的不同在于脂类与抗菌肽一起形成跨膜通道。通过 NMR、荧光淬灭及 CD 等方法证实,胞外的抗菌肽在与带电荷及疏水的细菌细胞膜相互作用时,形成 α 螺旋构象^[24]。结合到细胞膜上的肽的疏水残基极性头移位造成疏水域的裂口及引起细胞膜正向弯曲拉伸。裂口与拉伸进一步破坏了膜的完整性,当抗菌肽与脂类的比率达到一定临界值时,抗菌肽开始垂直定向于细胞膜,单环开始自我聚集,形成动态的肽-脂类超分子复合物^[25]。该环形孔的形成及易位决定于抗菌肽与脂类的比率,抗菌肽浓度太高时由于其正电荷侧链静电排斥作用导致孔稳定性降低。有研究报道,当脂类与 mellitin 的比率达到50时,有直径2.5 nm~3.0 nm的孔的形成,另外当该比率增加时,孔的直径随之增加^[20,26]。Magainin 诱导生成的“虫孔”直径较大,内径大约为3.0 nm~5.0 nm,外径则为7.0 nm~8.4 nm,每个孔仅有4~7个 magainin 单体,却有约90个脂质分子^[27,28]。

3) “毡毯”模型:阳离子抗菌肽平行排列在细胞壁表面形成类似“毡子”的结构,与其他模型一样,阳离子抗菌肽通过静电作用结合到细胞膜上,覆盖在磷脂双层上,当抗菌肽密度达到一定临界值时,细胞膜能量恶化,完整性丧失,细胞膜出现显著的弯曲从而破裂。此模型中阳离子抗菌肽的疏水部分并不插入细胞膜,细胞膜也并无槽的形成^[29]。Cecropin P1 以这种机制作用于微生物,通过对 cecropin P1 进行极化 ATR-FTIR 光谱学分析发现,该肽最初定向平行于膜表面,随着抗菌肽浓度的增加在膜表面形成了肽单体的浓缩层,最终导致细胞膜的破裂^[14]。

4) “凝聚”模型:膜的透化作用对于抗菌肽的抗菌活性是必要的但还不足以解释其杀菌活性,某些抗菌肽如 Gramicidin S 在低于其 MIC 时就能引起最大程度的膜去极化,这说明单单细胞膜去极化并不是微生物死亡的最关键的因素。凝聚模型认为抗菌肽插入到细胞膜后,由肽和脂质组成胶束复合物,

以凝聚物形式横跨细胞膜, 形成动态的孔, 抗菌肽透过这种机制也可以进入胞内。与虫孔模型不同, 在此模型中抗菌肽没有特定的取向^[30]。

2.4 细胞死亡

仅仅是膜通透性的改变不能完全解释抗菌肽的强杀菌作用, 细胞膜透化作用和细胞死亡不存在必然的联系, 某些抗菌肽在最低有效浓度时不会引起细胞膜的透化但是仍然可以杀死细菌。在细胞死亡的过程中, 细胞膜的透化作用与细胞内功能的破坏相比, 对细胞死亡的影响相对较小。许多抗菌肽穿过细胞膜在细胞内积累并干扰胞内正常功能, 引起细菌死亡, 因此研究者们认为抗菌肽存在着胞内作用靶点。胞内杀菌机制主要有以下几种^[31]: 1) 引起胞内物质的絮凝反应, 2) 抑制细胞壁生成, 3) 与核酸物质相结合, 4) 抑制核酸或蛋白质合成, 5) 抑制酶的活性, 6) 改变细胞膜: 抑制隔膜形成。鱼类抗菌肽 pleurocidin 的衍生物, 在其有效抑菌浓度时可以抑制 DNA、RNA 的合成而不引起细胞膜的透化^[32]。两个来源于牛中的抗菌肽 Bac5 和 Bac7, 抑制 *E. coli* 和 *Klebsiella pneumoniae* 中蛋白质和 RNA 的生成, 并引起 ATP 的下降阻止呼吸作用^[33]。富组蛋白 Histatins 与真菌细胞膜上的一个受体相结合后, 进入细胞质诱导正在进行积极呼吸的细胞 ATP 的大量损失, 从而导致细胞死亡, 此外还发现 Histatins 可以破坏细胞周期并导致活性氧簇的产生^[34]。

综上所述, 抗菌肽的作用机制根据其作用细胞的特异性、抗菌肽自身的浓度、微生物细胞膜的生物物理性质等不同。与此同时, 在杀灭同一种微生物时, 抗菌肽可能会运用超过一种机制, 如细胞膜透化机制与抑制胞内一种或几种重要物质的正常功能相结合来杀死微生物。另外需要注意的是, 在研究中所使用的模拟膜系统、运用的方法、抗菌肽所处状态的不同, 很可能得出的抗菌机制不同。目前许多研究者用多种方法、从不同角度来研究抗菌肽作用机理, 以期得到更为可靠的结果。

3 抗菌肽临床应用

3.1 抗菌肽临床应用优点

抗菌肽具有新的抗生素类所需要的很多特性, 它可以作为单独的抗菌剂使用, 也可以与传统的抗生素联合使用具有协同作用, 作为免疫调制剂或中和内毒素, 因此抗菌肽的临床应用潜力很大。尽管

抗菌肽在杀灭一些敏感病菌时效果不如特定的传统抗生素好, 但其优势之一就是能有效的作用于多重耐药性菌, 其杀菌作用十分迅速且具有复杂的细菌胞内作用靶点。

与传统抗生素相比, 抗菌肽具有许多临床应用的优点^[1]: 1) 抗菌肽除了能杀灭细菌、真菌、寄生虫和病毒之外, 也对癌细胞有一定杀伤作用, 此外抗菌肽在先天及获得性免疫方面扮演着十分重要的角色; 2) 传统抗生素对细菌的作用靶点通常是单一的个体或者族群(如青霉素结合蛋白、拓扑异构酶等), 而抗菌肽的作用靶点并不如此特定, 可能存在多靶点; 3) 在耐药性上, 传统抗生素的抗药性菌产生频率大约为 10^{-7} 至 10^{-10} , 或者仅仅在亚 MIC 浓度下几代产生, 而对于抗菌肽来说, 耐药性一般不能直接产生, 需要在亚 MIC 下诱导许多代后才有耐药性菌的产生; 4) 抗菌肽由于蛋白酶的水解作用, 其半衰期较传统抗生素要短许多; 5) 抗菌肽可以相对独立的发挥其抗菌作用, 也可以与其他因子协同作用, 显示出更高的活性, 抗菌肽之间, 抗菌肽与传统抗生素具有协同作用, 也与乳铁蛋白、溶菌酶等发生作用以提高活性^[35]。

3.2 抗菌肽临床应用现状

抗菌肽类药物已经开始走入医药市场, 已知的有两种局部性和两种全身性应用于临床的抗菌肽类药物, 局部应用的药物包括 polymyxins 和 gramicidin S, 用来治疗由 *P. aeruginosa* 和 *Acinetobacter baumannii* 引起的感染, 临床证实其安全及有效, 也没有发现抗药性。不幸的是 Polymyxins 和 gramicidin S 都具有很大的毒性, 这阻碍了其作为全身用药的使用。临床上一般将 polymyxins 和 gramicidin S 一起用于烧伤后皮肤再生、手术伤口灌洗、消化道选择性去污染、眼部的表面感染及小伤口感染等。后续很多研究努力降低其毒性, 效果甚微, 却发现了 colistin (polymyxin E1, E2, E3) 的前体 colomycin, 能全身性的用于患有纤维囊泡症的病人的肺部感染^[36]。Daptomycin 是 1 种阴离子脂肽, 针对革兰氏阳性菌有杀菌作用, 2003 年 9 月, FDA 批准其用于并发性的皮肤感染, 有趣的是其功能依赖于 Ca^{2+} , 在 Ca^{2+} 的存在下 daptomycin 与细菌细胞膜的相互作用与阳离子抗菌肽类似^[37]。

Pexiganan 是 magainin2 的 1 种同系物, 具有 22 个氨基酸, 是第 1 个应用于糖尿病并发症 LocilexTM

局部治疗的抗生素乳膏。1999年FDA因为其效用与现有的抗生素相比并不显著否决了这项新药,尽管在进行II期临床试验时,pexiganan具有良好的疗效^[38]。Iseganan是猪的内源性抗微生物多肽protegrin-1的类似物,Trotti A等报道Iseganan在I期临床试验中没有能够避免或减轻患有头与颈部恶性肿瘤的病人在接受放射疗法时的口腔黏膜炎及呼吸器相关性肺炎^[39]。目前应用前景很好的有MX-226和MX-594AN两种抗菌肽类药物。MX-226主要用

于插管相关的感染,在已完成的III期临床试验中,MX-226降低了49%的局部导管感染率和21%的导管微生物定植,2005年Migenix和Cadence Pharmaceuticals合作启动了证实其抑制局部导管感染效力的IIIb期临床试验。MX-594AN是1种新的用于治疗座疮的药物,2003年b临床试验完成(<http://www.migenix.com>)。除以上介绍的药物外,还有一些抗菌肽类药物进入临床或临床前试验状态,如表1所示^[1,40-42]。

表1 抗菌肽类药物开发情况
Table 1 Clinical development of antimicrobial peptides

产品 Product	公司 Company	治疗疾病 Applications	开发阶段 Phase of clinical trials
Polymixin B-Collistin-Colomycin	RX Generic Drugs	用于G-引起的皮肤感染	已上市
Daptomycin	Cubist Pharmaceuticals	用于G+引起的皮肤感染,脓毒症	2003年9月FDA批准上市
Cyanovirin-N	Biosyn	HIV病毒	新药审查中
Pexiganan	Genaera plymouthMeeting	应用于糖尿病并发症 Locilex™ 局部治疗	FDA 否决
Iseganan(1B-367, protegrin)	Intrabiotics	粘膜炎、胆囊纤维化、肺部感染	期失败
Enfuvirtide, T-20	Trimeris	艾滋病	期
MX-226(CPI-226)	Cadencepharm	中心静脉导管感染	b期
PG-1 protegrin	Intrabiotics	金黄色酿脓葡萄球菌等引起的腹膜感染	期
MX-594AN	Migenix	座疮	2003年 b完成
Neuprex	Xoma Corp	脑膜炎	期失败
P113/P113D	Demegen/Pacgen	口腔粘膜炎	b期
Hlf1-11	AM-Pharma	同种干细胞移植术中细菌和真菌感染	期
D2A2	Demegen	烧伤、感染	期
SB006	SpiderBiotech	G-引起的感染	临床前试验
Plectasin	Novozymo	G-引起的感染	临床前试验
IMXC001	Inimex Pharmaceuticals	脓毒症	临床前试验
lactoferricin-B	AM	真菌感染	临床前试验
HB 50	Helix Biomedix	金黄色酿脓葡萄球菌引起的伤口感染	临床前试验

抗菌肽所具有的生物活性特点使之具有更广泛的用途,如被用来研究成为化学避孕套以防止性传播疾病的传播,也用来作为探针检测细菌或者真菌类感染。在恶性肿瘤的治疗中,多向性抗药(MDR)是许多癌症化学治疗失败的原因之一,通常由于P-糖蛋白的过度表达所引起,研究证实一些抗菌肽通过触发编程性细胞死亡或形成离子通道对癌细胞具有细胞毒性且副作用与现有的传统化学治疗药物相比要小很多,其中的一些抗菌肽还可以作用于MDR癌细胞^[43]。抗菌肽除了能够直接发挥其抗菌作用外,

还可以作为药物载体。施药载体所必须具备的2个条件是:1)无毒性或低毒性;2)具有渗透细胞的能力。Laszlo Otvos将昆虫抗菌肽pyrrochoricin和其衍生物作为施药运载工具,证实pyrrochoricin同系物具有运载抗原依赖性疫苗的潜力^[44]。Magainin与溶于50%乙醇的表面活性剂增强剂N-月桂酰肌氨酸一起可以破坏皮肤角质层中的脂质结构,从而增加了47倍的皮肤透过性,这一结果对穿皮给药法意义重大^[45]。

3.3 抗菌肽应用所面临的问题及解决方案

高生产成本是阻碍抗菌肽大规模临床应用的最

首要的问题, 现有的抗菌肽价格大约为 50-400 美元每克, 这对于大多数人都难以负担, 因此急需建立商业化生产平台。很多研究者在致力于解决生产成本的问题, T-20 是一种 HIV 结合抑制肽, 由 Roche 公司第一次采用固相-液相结合的方法实现其吨级生产。合成法生产抗菌肽时, 减少肽的大小十分重要, 很多药业公司开始寻找更小的抗菌肽。运用基因工程手段, 在微生物中进行重组表达是减少成本的另一个选择。Novozyme 公司(<http://www.novozymes.com/en>)报道其利用真菌表达系统表达了符合临床给药要求的高产量及高活性 Plectasin, 该表达系统也已被用来生产其他的蛋白质。Plectasin 是第一个具有临床应用潜力的真菌防御素, 动物实验证实了其在治疗细菌性腹膜炎和肺炎的有效性^[46]。

尽管很多抗菌肽在体外试验中表现出了抗菌活性, 但在生理盐及血清条件下, 其抗菌活性几乎消失。人 β 防御素在高盐浓度的囊性纤维化支气管肺液中丧失了其抗 *P. aeruginosa* 能力, 从而导致致命的慢性感染^[47]。然而有些肽如 polyphemusins 其活性对盐浓度不是十分敏感, 可以通过改变抗菌肽的亲水疏水性、电荷及 α 螺旋度来降低多肽对盐的敏感性^[48]。

抗菌肽抵御细菌等的感染已经有很长的历史, 其抗菌机制决定了敏感性细菌要产生抗药性的话, 其细胞膜结构必须有很大的改变, 而这种结构改变极可能对细菌本身有着更大的生命威胁, 因此敏感细菌的耐药性似乎不太可能。而抗菌肽的多样性、感染方式的不同及抗菌肽作用机制的差异也预示着天然的细菌群体产生抗药性的产生十分困难。不过总存在着一定的病菌, 由于有着十分稳定的细胞膜结构或功能性特点使之具有天生的耐药性。另外 Perron GG 等报道, 在实验室中对 *Escherichia coli* 和 *Pseudomonas fluorescens* 进行持续不断的筛选, 经过了 600~700 代后, 22/24 的谱系独立进化出了可遗传的对阳离子抗菌肽 pexiganan 的耐药性^[49]。这一研究结果显示, 抗菌肽在临床应用时, 也有可能产生耐药细菌, 虽然其可能性比传统抗生素小的多, 但也不得不提醒我们在用抗菌肽进行治疗时进行严格的调控以避免耐药性的出现。

目前抗菌肽用于临床治疗还存在着其他的制约

因素, 如可能存在的毒性问题、对抗菌肽的药效学及药物代谢动力学研究的不足等, 不过研究者们都在致力于解决这些问题。人们开始寻找更多的适合大量生产抗菌肽的体系, 酵母菌、大肠杆菌、植物等等表达体系都被用来研究其生产能力及活性。而对天然抗菌肽的结构改造, 除了让其分子更小、活性更高外, 也减少了对真核生物的毒性及缩小生产成本。受到瞩目的耐药性问题虽然有研究证实其产生的可能性, 但都是在严格的实验条件下, 经过很多代的筛选而出现, 实际应用时相对来讲耐药菌的产生还是很困难的。总之, 在传统抗生素耐药性问题十分严峻的情况下, 抗菌肽的临床应用潜力很大。

4 结束语

抗菌作为天然免疫分子是许多生物抵御病菌感染的“化学屏障”, 其有效抵御病毒的历史十分久远, 可能随着生物的进化而进化, 而一些研究也表明在生物体内存在着抗菌肽的信号通路。因此, 可以认为抗菌肽是生物体的一个部分, 其在生物体内所具有的作用可能还有一些有待发现。另外其抗菌机制不同于传统抗生素, 产生耐药性菌株的可能性大大降低, 因此有很大的潜力成为传统抗生素的替代品或辅助治疗品。抗菌肽应用于临床方面有 2 个途径: 1) 直接作为临床应用药物, 杀死病原体; 2) 利用外界刺激或者分子调控等方法调节内源性抗菌肽的表达。前者已经有了许多进展, 尽管到现在为止真正应用到治疗中的抗菌肽类药物很少, 也存在着一些问题尚未解决, 很多这方面的研究工作正在进行, 一些大的制药公司也关注于几种抗菌肽并进行其临床前及临床研究。对于第 2 种途径, 可能是解决很多现代医疗难题的更好、更彻底的选择, 其面临的挑战也更大。目前关于抗菌肽的研究十分多, 包括从分子水平上研究抗菌肽基因的调控途径, 分析抗菌肽结构与活性的关系, 人为改造或合成抗菌肽, 找到合适的生产体系以期得到商业化生产, 抗菌肽药物的临床研究等等。我们相信随着研究的深入, 问题将一个个被攻破, 抗菌肽将会越来越多的造福于人类。

参考文献

[1] Marr AK, Gooderham WJ, Hancock RE. Antibacterial

- peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology*, 2006, **6**(5): 468–472.
- [2] Holak TA, Engstroem A, Kraulis PJ, *et al.* The solution conformation of the antibacterial peptide cecropin A: a nuclear magnetic resonance and dynamical simulated annealing study. *Biochemistry*, 1988, **27**(20): 7620–7629.
- [3] 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**(15): 5449–5453.
- [4] Colilla FJ, Rocher A, Mensez E. Gamma-purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. *FEBS Lett*, 1990, **270**(1-2): 191–194.
- [5] Douglas SE, Gallant JW, Liebscher RS, *et al.* Identification and expression analysis of hepcidin-like antimicrobial peptides in bony fish. *Dev Comp Immunol*, 2003, **27**(6-7): 589–601.
- [6] Lai R, Liu H, Hui Lee W, *et al.* An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **295**(4): 796–799.
- [7] Rozek A, Friedrich CL, Hancock RE. Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry*, 2000, **39**(51): 15765–15774.
- [8] Hoover DM, Rajashankar KR, Blumenthal R, *et al.* The structure of human Beta-defensin-2 shows evidence of higher-order oligomerization. *J Biol Chem*, 2000, **275**(42): 32911–32918.
- [9] Lu Y, Ma Y, Wang X, *et al.* The first antimicrobial peptide from sea amphibian. *Mol Immunol*, 2008, **45**(3): 678–681.
- [10] Finlay BB, Hancock RE. Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? *Nat Rev Microbiol*, 2004, **2**(6): 497–504.
- [11] Niyonsaba F, Hirata M, Ogawa H, *et al.* Epithelial cell-derived antibacterial peptides human beta-defensins and cathelicidin: multifunctional activities on mast cells. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2003, **2**(3): 224–231.
- [12] Yang D, Biragyn A, Hoover DM, *et al.* Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol*, 2004, **22**: 181–215.
- [13] Davidson DJ, Currie AJ, Reid GS, *et al.* The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *J Immunol*, 2004, **172**: 1146–1156.
- [14] Yeaman R, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev*, 2003, **55**(1): 27–55.
- [15] Powersand JP, Hancock RE. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, 2003, **24**(11): 1681–1691.
- [16] Hancock RE, Chapple DS. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, **43**(6): 1317–1323.
- [17] Peschel A, Jack RW, Otto M, *et al.* *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine. *J Exp Med*, 2001, **193**(9): 1067–1076.
- [18] Hsu ST, Breukink E, de Kruijff B, *et al.* Mapping the targeted membrane pore formation mechanism by solution NMR: the nisin Z and lipid II interaction in SDS micelles. *Biochemistry*, 2002, **41**(24): 7670–7676.
- [19] Fehlbaum P, Bulet P, Chernysh S, *et al.* Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(3): 1221–1225.
- [20] Yang L, Harroun TA, Weiss TM, *et al.* Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys J*, 2001, **81**(3): 1475–1485.
- [21] Breukink E, de Kruijff B. The lantibiotic nisin, a special case or not? *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1462**(1-2): 223–234.
- [22] Latal A, Degovics G, Epan RF, *et al.* Structural aspects of the interaction of peptidyl-glycylleucine-carboxamide, a highly potent antimicrobial peptide from frog skin, with lipids. *Eur J Biochem*, 1997, **248**(3): 938–946.
- [23] Lehrer RI, Ganz T. Cathelicidins: a family of endogenous antimicrobial peptides. *Curr Opin Hematol*, 2002, **9**(1): 18–22.
- [24] Hara T, Mitani Y, Tanaka K, *et al.* Heterodimer formation between the antimicrobial peptides magainin 2 and PGLa in lipid bilayers: a cross-linking study. *Biochemistry*, 2001, **40**(41): 12395–12399.
- [25] Hara T, Kodama H, Kondo M, *et al.* Effects of peptide dimerization on pore formation: Antiparallel disulfide-dimerized magainin 2 analogue. *Biopolymers*, 2001, **58**(4): 437–446.
- [26] Ladokhin AS, Selsted ME, White S H, *et al.* Sizing membrane pores in lipid vesicles by leakage of co-encapsulated markers: pore formation by melittin. *Biophys J*, 1997, **72**(4): 1762–1766.
- [27] Matsuzaki K, Sugishita K, Ishibe N, *et al.* Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2. *Biochemistry*, 1998, **37**(34): 11856–11863.
- [28] Matsuzaki K, Sugishita K, Harada M, *et al.* Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 1997, **1327**(1): 119–130.

- [29] Shai Y, Oren Z. From “carpet” mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides*, 2001, **22**(10): 1629–1641.
- [30] Jenssen H, Hamill P, Hancock RE. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*, 2006, **19**(3): 491–511.
- [31] Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*, 2005, **3**(3): 238–250.
- [32] Patrzykat A, Friedrich CL, Zhang L, *et al.* Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, **46**(3): 605–614.
- [33] Skerlavaj B, Romeo D, Gennaro R. Rapid membrane permeabilization and inhibition of vital functions of gram-negative bacteria by bacteriocins. *Infect Immun*, 1990, **58**(11): 3724–3730.
- [34] Kavanagh K, Dowd S. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. *J Pharm Pharmacol*, 2004, **56**(3): 285–289.
- [35] Hancock R E. The therapeutic potential of cationic peptides. *Expert Opin Investig Drugs*, 1998, **7**(2): 167–174.
- [36] Ledson MJ, Gallagher MJ, Cowperthwaite C, *et al.* Four years’ experience of intravenous colomycin in an adult cystic fibrosis unit. *Eur Respir J*, 1998, **12**(3): 592–594.
- [37] Powers JP, Straus SK, *et al.* Lipid-specific binding of the calcium-dependent antibiotic daptomycin leads to changes in lipid polymorphism of model membranes. *Chem Phys Lipids*, 2008, **154**(2): 120–128.
- [38] Lamb HM, Wiseman LR. Pexiganan Acetate. *Drugs*, 1998, **56**(6): 1047–1052.
- [39] Trotti A, Garden A, Warde P, *et al.* A multinational, randomized phase III trial of iseganan HCl oral solution for reducing the severity of oral mucositis in patients receiving radiotherapy for head-and-neck malignancy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004, **58**(3): 674–681.
- [40] Schröder JM, Harder J. Antimicrobial peptides in skin disease. *Drug Discov Today Ther Strateg*, 2006, **1**: 93–100.
- [41] Zhang L, Falla TJ. Antimicrobial peptides: therapeutic potential. *Expert Opin Pharmacother*, 2006, **7**(6): 653–663.
- [42] Giuliani A, Pirri G, Nicoletto SF. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Central European Journal of Biology*, 2007, **2**: 1–33.
- [43] Kim S, Kim SS, Bang YJ, *et al.* *In vitro* activities of native and designed peptide antibiotics against drug sensitive and resistant tumor cell lines. *Peptides*, 2003, **24**(7): 945–953.
- [44] Otvos L Jr, Cudic M, Chua BY, *et al.* An insect antibacterial peptide-based drug delivery system. *Mol Pharmacol*, 2004, **1**(3): 220–232.
- [45] Kim YC, Ludovice PJ, Prausnitz MR. Transdermal delivery enhanced by magainin pore-forming peptide. *J Control Release*, 2007, **122**(3): 375–383.
- [46] Mygind PH, Fischer RL, Schnorr KM, *et al.* Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature*, 2005, **437**(7061): 975–980.
- [47] Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, *et al.* Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell*, 1997, **88**(4): 553–560.
- [48] Friedrich C, Scott MG, Karunaratne N, *et al.* Salt-resistant alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, **43**(7): 1542–1548.
- [49] Perron GG, Zasloff M, Bell G. Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. *Proc Biol Sci*. 2006, **273**(1583): 251–256.