

## 研究报告



## V型羊毛硫肽雷可肽的抑菌机制

洪佳丽 王业民 邓子新 陶美凤\*

上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海抗生素耐药研究联合创新中心 教育部代谢与发育科学合作联合实验室 上海 200030

**摘要:**【背景】雷可肽(Lexapeptide)为首例V型羊毛硫肽家族化合物,具有较好的抗革兰氏阳性菌活性,对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)和表皮葡萄球菌(Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis*, MRSE)的抑制作用强于广泛应用的食品防腐剂乳酸链球菌素,其对pH和高温的稳定性也优于乳酸链球菌素,具有较好的应用前景。由于抑菌机制不明确,限制了雷可肽的开发应用。【目的】探究雷可肽抑菌作用特征以及作用机制,为雷可肽开发应用奠定基础。【方法】通过菌落计数法与 $Mg^{2+}$ 试验表征雷可肽抑菌动力学曲线;采用流式细胞仪和透射电子显微镜研究雷可肽在靶细胞表面的成孔性;利用高效液相色谱与基质辅助激光解吸电离的时间飞行质谱分析雷可肽处理对革兰氏阳性菌肽聚糖前体积聚的影响。【结果】雷可肽在抑菌动力学上与乳酸链球菌素没有显著差别,但在更宽的 $Mg^{2+}$ 浓度范围内仍可保持抑菌活性。雷可肽处理后的细胞具有透过荧光染料的能力,生物型透射电镜观察到细胞发生破损。此外,在雷可肽作用后的细胞中检测到肽聚糖合成的前体尿嘧啶核苷二磷酸-N-乙酰胞壁酸五肽。【结论】雷可肽能够通过抑制细胞壁肽聚糖生物合成并造成细胞损伤进而获得通透性,以此来抑制革兰氏阳性菌生长。

**关键词:** 雷可肽, 抑菌机制, 羊毛硫肽, 乳酸链球菌素, 肽聚糖前体, 细胞膜穿孔

## The antibacterial mode of action of lexapeptide

HONG Jiali WANG Yemin DENG Zixin TAO Meifeng\*

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai-Islamabad-Belgrade Joint Innovation Center on Antibacterial Resistances, Joint International Research Laboratory of Metabolic and Development Sciences, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China

**Abstract:** [Background] Lexapeptide is the first member of the class V lanthipeptide family. *In vitro* bioassay indicated that lexapeptide has remarkable antibacterial activity against various  $G^+$  bacteria, and shows stronger activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) than nisin. Lexapeptide also exhibits better thermo-stability and pH-stability than nisin. The mode of actions of lexapeptide remains uncovered, hindering its potential application. [Objective] Through investigation into the antibacterial mode of action of lexapeptide to lay the foundation for its further application. [Methods] The antibacterial kinetics of

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31770036); Shanghai-Islamabad-Belgrade Joint Innovation Center on Antibacterial Resistances Project (19430750600)

\*Corresponding author: E-mail: tao\_meifeng@sjtu.edu.cn

Received: 28-01-2021; Accepted: 25-03-2021; Published online: 22-04-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31770036); 上海抗生素耐药研究联合创新中心项目(19430750600)

\*通信作者: E-mail: tao\_meifeng@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2021-01-28; 接受日期: 2021-03-25; 网络首发日期: 2021-04-22

lexapeptide was characterized by colony-forming unit (CFU) counting and magnesium ion assay. The pore forming ability of lexapeptide was assessed by flow cytometry (FCM) and transmission electron microscopy (TEM). High performance liquid chromatography (HPLC) and matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) were used to analyze lexapeptide's effect on the accumulation of peptidoglycan biosynthetic precursor in  $G^+$  bacteria. **[Results]** Compared to nisin, the antibacterial activity of lexapeptide was less sensitive to the inhibition by magnesium ion. Bacterial cells treated with lexapeptide gained permeability to fluorescent dye. Damaged morphology of those cells was observed with TEM. A peptidoglycan biosynthetic precursor, UDP-NAcMur-pentapeptide, was determined in the lexapeptide-treated cells. **[Conclusion]** Lexapeptide inhibits the growth of  $G^+$  bacteria by inhibiting the biosynthesis of peptidoglycan in cell wall as well as permeabilizing the cell membrane.

**Keywords:** lexapeptide, mode of action, lanthipeptide, nisin, peptidoglycan precursor, pore formation in cell membrane

羊毛硫肽(Lanthipeptide)是一类由核糖体合成的翻译后修饰肽<sup>[1-2]</sup>, 分子中有由 Ser 或 Thr 脱水形成的 2,3-脱氢丙氨酸(Dha)或 2,3-脱氢氨基丁酸(Dhb)残基, 以及由 Cys 与 Dha 或 Dhb 发生迈克尔加成而形成的特征性结构单元——羊毛硫氨酸或甲基羊毛硫氨酸。(甲基)羊毛硫氨酸修饰使肽链骨架中插入多环结构, 赋予羊毛硫肽分子特定的生物活性、一定程度的热稳定性和对蛋白酶的抗性<sup>[1,3]</sup>。具有抗菌活性的羊毛硫肽称为羊毛硫细菌素(Lantibiotic)。最早发现抗菌活性最强的羊毛硫细菌素是乳酸链球菌发酵产生的乳酸链球菌素(Nisin) (图 1), 其抗菌活性发现与青霉素同年(1928年)<sup>[4]</sup>。由于抗菌机制独特、不易产生耐药

突变、与临床抗生素药物间没有交叉耐药, 羊毛硫细菌素成为最近新兴抗微生物制剂的研发热点。

乳酸链球菌素由 34 个氨基酸残基组成, 分子上有 5 个羊毛硫氨酸硫醚环, C 端为赖氨酸。乳酸链球菌素有 2 种抑菌模式: (1) 结合细胞壁肽聚糖合成前体 Lipid II 抑制肽聚糖合成<sup>[5-6]</sup>; (2) 与 Lipid II 形成复合物插入细胞膜内导致穿孔, 使离子、氨基酸和 ATP 等流出<sup>[7-8]</sup>。经核磁共振(Nuclear Magnetic Resonance, NMR)结构计算和分子动态模拟, 推测乳酸链球菌素利用 N 端的 A 环和 B 环与 Lipid II 对接形成结合囊, 像棒球手套一样包裹着 Lipid II 的焦磷酸十一异戊二烯基部分, 也称焦

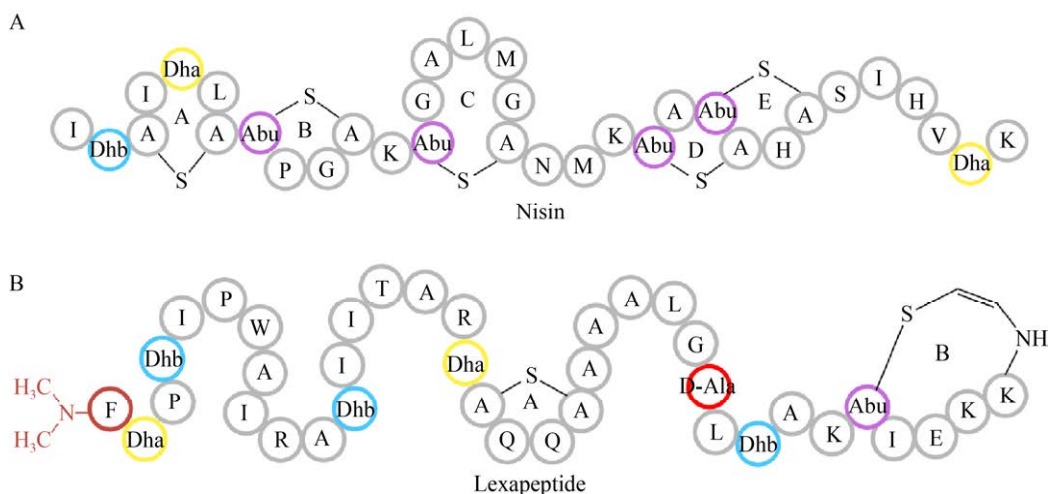


图 1 乳酸链球菌素(A)与雷可肽(B)的结构  
Figure 1 Structure of nisin (A) and lexapeptide (B)

磷酸笼。由 Dhb2、Ala3、Ile4、Dhb5 和 Abu8 等残基氢键稳定焦磷酸笼结构<sup>[9]</sup>。此外, 乳酸链球菌素结构上长链尾部以及 C 端带正电荷的氨基酸结构在帮助分子插入并锚定在革兰氏阳性菌细胞膜内起到关键作用<sup>[10]</sup>。与乳酸链球菌素作用相似的还有 Mutacin 1140<sup>[11]</sup>、Cinnamycin<sup>[12]</sup>等。Mersacidin<sup>[13]</sup>等也能结合 Lipid II 抑制肽聚糖的生物合成, 但与乳酸链球菌素不同, Mersacidin 无法形成膜穿孔。

雷可肽(Lexapeptide)是利用文库表达与功能分析方法(Library Expression and Analysis System, LEXAS)<sup>[14]</sup>对娄彻氏链霉菌 Sa135 的基因组文库进行筛选而发现的羊毛硫肽类化合物(图 1)<sup>[15]</sup>。雷可肽生物合成途径中的羊毛硫氨酸合成酶由 3 个蛋白质 Lxm K/X/Y 组成, 根据羊毛硫肽的分类准则<sup>[16]</sup>, 雷可肽被鉴定为 V 型羊毛硫肽<sup>[15]</sup>。雷可肽由 38 个氨基酸残基构成, 有 N 端 N,N-双甲基苯丙氨酸、Dha、Dhb、第 28 位 D-丙氨酸等修饰残基, 还有 Dha19 与 Cys22 之间形成的羊毛硫氨酸硫醚环和 Abu33 与 Cys38 之间形成的 C-末端氨基乙烯基甲基半胱氨酸(AviMeCys)环。与乳酸链球菌素结构相比, 雷可肽有 2 个不相邻的环及一条 18 肽链尾巴。体外生物活性检测发现, 雷可肽具有较强的抗革兰氏阳性菌活性, 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)与耐甲氧西林表皮葡萄球菌(Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis*, MRSE)的抑制作用优于乳酸链球菌素, 其对 pH 和高温的稳定性也优于乳酸链球菌素<sup>[15]</sup>。本研究将从抑菌作用曲线和靶细胞通透性改变等方面展开雷可肽抑菌机制研究, 以期为进一步开发应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*) GX28/pJLXM 含有雷可肽生物合成最小基因簇<sup>[15]</sup>, 用于

发酵分离雷可肽。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 25293 为抗菌活性测试菌株。

### 1.2 培养基与主要试剂

Mueller-Hinton Broth (MHB), Oxoid 公司, 用于培养金黄色葡萄球菌 ATCC 25293。

氯霉素(Chloramphenicol, CHL)、万古霉素(Vancomycin, VAN)、乳酸链球菌素(Nisin)等抗生素, Aladdin 公司; 荧光染料 SYTOX Green, Thermo Fisher Scientific 公司。

### 1.3 主要仪器

酶标仪, BioTech 公司; 超高效液相色谱-离子淌度-四极杆飞行时间质谱仪, Thermo Fisher 公司; 冷冻超薄切片机, Leica 公司; 生物型透射电子显微镜, Thermo Scientific 公司; 分析型流式细胞仪, Beckman 公司; 高效液相色谱, Agilent 公司; 基质辅助激光解离的飞行时间质谱, Bruker 公司。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 雷可肽制备及最小抑菌浓度测定

雷可肽的发酵、分离纯化及鉴定参考文献[15], 采用超高效液相色谱-离子淌度-四极杆飞行时间质谱仪进行结构验证。

最小抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)依据微孔板法<sup>[17]</sup>测定。指示菌为金黄色葡萄球菌 ATCC 25293。首先用 MHB 培养基于 37 °C、220 r/min 培养金黄色葡萄球菌 12–14 h。在 96 孔板中, 第 1 列加入 196  $\mu$ L 无菌 MHB, 第 12 列加入 200  $\mu$ L 无菌 MHB 作为无菌、无抗生素的双阴性对照, 其余各列分别加入 100  $\mu$ L 无菌 MHB。将配制好的抗生素溶液分别加入第 1 列的 8 个孔中, 混匀; 采用梯度稀释法从第 1 列中吸取 100  $\mu$ L 混有抗生素的培养液至第 2 列中, 混匀; 依此类推至第 10 列后吸出多余的 100  $\mu$ L 培养液弃去, 第 11 列加入等量 DMSO 作为阴性对照。将培养过夜的菌体用新鲜 MHB 培养基稀释 1 000 倍, 取 100  $\mu$ L 稀释的菌液加入

第1列至第11列的孔中。37 °C恒温培养22–24 h, 用酶标仪读取  $OD_{600}$  值。MIC 值定义为抑制超过90%浓度细菌生长的最低抗生素浓度。以万古霉素和乳酸链球菌素作为对照, 每个样品3个平行。

#### 1.4.2 抑菌曲线测定

采用菌落计数法 (Colony-Forming Unit, CFU)<sup>[18-19]</sup>, 把抗生素加入对数生长期的细菌培养物中继续培养, 不同时间取样进行菌落计数, 绘制雷可肽或乳酸链球菌素的抑菌动力学曲线。采用涂布法进行 CFU 计数, 受试菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC 25293。当细菌生长到  $OD_{600}$  约为0.4–0.5时, 将菌液均分为5份(每份5 mL), 分别加入乳酸链球菌素或雷可肽母液至终浓度为1×MIC 和 10×MIC, 空白对照组则加入 DMSO。37 °C、220 r/min 摇床培养, 分别在0、1、2、4、8 h 取出菌液 100  $\mu$ L, 用 MHB 培养液梯度稀释  $10^2$ – $10^{10}$  倍, 并涂布至不加抗生素的 MHB 固体培养基, 继续培养 2 d 后进行菌落计数, 绘制抑菌曲线。每组重复3次。

#### 1.4.3 $Mg^{2+}$ 对于雷可肽抑菌活性的影响

在 MHB 培养基中加入  $Mg^{2+}$  至终浓度为0–16 mmol/L、加入雷可肽至 2×MIC 或 4×MIC, 充分预混后分装至96孔板中, 每孔100  $\mu$ L。设置不加  $Mg^{2+}$  的雷可肽预混 MHB 为阴性对照, 乳酸链球菌素作为阳性对照, 每组3个平行。细菌的过夜培养物按 1:1 000 用空白培养基稀释得稀释菌液, 按等体积将稀释菌液加入到预混培养基中(含不同浓度  $Mg^{2+}$  和雷可肽或乳酸链球菌素)。加样完成后, 将96孔板放入37 °C恒温培养箱中培养22–24 h, 用酶标仪读取  $OD_{600}$  值。用 GraphPad Prism 处理数据并绘制存活率-镁离子浓度曲线, 分析外加  $Mg^{2+}$  对雷可肽抑菌能力的影响。在实验组与对照组数据均扣除培养基背景( $OD_{600}$ )后, 存活率(%)=实验组  $OD_{600}$ /双阴性对照组  $OD_{600}$  (不添加抗生素与  $Mg^{2+}$ ) $\times$ 100。

#### 1.4.4 流式细胞仪观察细胞通透性

金黄色葡萄球菌 ATCC 25293 在 37 °C、

220 r/min 培养至对数生长期, 加入抗生素至10×MIC 处理。阳性对照为乳酸链球菌素, 实验组为雷可肽, 阴性对照为溶剂 DMSO, 37 °C、220 r/min 恒温培养2 h。

流式细胞仪分析前处理步骤需要经过染色和脱色处理: 用 PBS 洗涤样品3次以除尽抗生素; 加入等体积 1 000 nmol/L SYTOX Green 染料溶液, 37 °C、220 r/min 培养15 min, 过程注意避光; 用无菌 PBS 洗涤3次确保洗去胞外游离的染料, 菌体重悬于1 mL 无菌 PBS 溶液中。重悬的菌液浓度约为  $2\times(10^5-10^7)$  个/mL, 收集100 000个细菌作流式细胞仪分析。SYTOX Green<sup>[20]</sup> 可以与死细胞的 DNA 结合, 激发光/发射光波长为504 nm/523 nm, 该条件下能检测到绿色荧光, 因此选用激发光波长为488 nm 的氩灯作为检测光源。同时, 打开 FlowJo 软件, 建立双参数 FSC/SSC 散点图, 选用“对数”来表示前向角(FSC, 横坐标)和侧向角(SSC, 纵坐标)的信号值, 并根据初始样品信号调节光电倍增管电压, 将细胞群控制在图像正中。在双参数 FSC/SSC 散点图中找到细菌最集中的区域设门, 圈出所需要分析的细菌。FITC 通道检测波长 530 nm/30 nm, 收集并分析数据。

#### 1.4.5 生物型透射电镜(120 kV)观察细菌表面形态学变化

生物型透射电镜样品前处理在文献[21]描述的基础上有所调整。受试菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC 25293, 分别加入1×MIC 与 2×MIC 雷可肽(终浓度), DMSO 为阴性对照, 处理2 h。洗去抗生素后, 加入2.5%戊二醛重悬, 置于4 °C 固定12–16 h。接下来使用0.1 mol/L PBS 漂洗细胞4次以除去戊二醛。加1%锇酸(终浓度), 在4 °C 条件下处理2 h。再次使用0.1 mol/L PBS 漂洗细胞4次以除去锇酸。进入脱水处理步骤: 依次使用乙醇(50%、70%、90%乙醇, 乙醇:丙酮=1:1, 90%丙酮, 100%丙酮)处理细胞, 完成梯度脱水。室温下使用丙酮:环氧树脂=1:1 处理细胞1 h, 丙酮:环氧树脂=1:2 处理细胞过夜, 更换2次纯树脂静置

处理 4 h, 最后放入 60 °C 烘箱聚合 48 h。

样品前处理完成后使用冷冻超薄切片仪切片, 醋酸铀染色, 每个铜网上承载 3 张切片以备观察, 采用 120 kV 生物型透射电子显微镜观察细胞形态。

#### 1.4.6 MALDI-TOF MS 检测细胞肽聚糖合成前体的积累

细胞于 37 °C、220 r/min 条件下生长到  $OD_{600}$  约为 0.5 时, 加入终浓度为 130  $\mu\text{g/L}$  氯霉素培养 15 min, 再分别加入 DMSO、10 $\times$ MIC 的万古霉素、乳酸链球菌素、雷可肽处理 1 h。4 °C、4 000 r/min 离心 30 min 去上清, 使用 ddH<sub>2</sub>O 提取细胞壁前体物质<sup>[22]</sup>。将样品冻干后溶解, 使用 HPLC 与 MALDI-TOF MS 检测肽聚糖合成前体的积累, 受试菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC 25293。

流动相为 5 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液, 等梯度洗脱。色谱柱型号为 Agilent Zorbax SB300-C18 (5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm $\times$ 250 mm), 洗脱条件为: 60 min, 100%, 室温, 流速为 0.6 mL/min。接样冻干, 脱盐后使用 MALDI-TOF MS 检测分子量。

## 2 结果与分析

### 2.1 抑菌动力学

在对数生长期的金黄色葡萄球菌 ATCC 25293 培养物中加入雷可肽或乳酸链球菌素继续培养, 处理不同时间后取样统计存活细菌数(CFU), 得到的抑菌曲线如图 2 所示。在高浓度(10 $\times$ MIC)时, 雷可肽或乳酸链球菌素处理 1 h 后活细菌数急剧下降, 处理 2 h 后存活菌落数接近可检测下限, 表明雷可肽与乳酸链球菌素均可较快地杀死对数生长期的供试菌。在低浓度(1 $\times$ MIC)时, 雷可肽和乳酸链球菌素均需 8 h 才能完全杀死对数生长期的细菌。

### 2.2 Mg<sup>2+</sup>对于雷可肽抑菌活性的影响

研究表明, Mg<sup>2+</sup>往往与膜脂结合来维护细胞稳定性<sup>[23]</sup>。本研究也发现, 较高浓度( $\geq 10$  mmol/L) Mg<sup>2+</sup>既能够抑制乳酸链球菌素的抑菌作用(与文献

报道 Mg<sup>2+</sup>能够抑制乳酸链球菌素的抑菌活性一致<sup>[24-25]</sup>), 也能抑制雷可肽的抑菌作用。进一步测试了低浓度(0–8 mmol/L) Mg<sup>2+</sup>对 1 $\times$ MIC、2 $\times$ MIC 的雷可肽和乳酸链球菌素抑菌活性的影响, 图 3 为 2 种羊毛硫细菌素的存活率-镁离子浓度曲线。从图 3 中可以看出: (1) 在外加 Mg<sup>2+</sup>浓度较低时( $\leq 3$  mmol/L), 雷可肽和乳酸链球菌素的抑菌

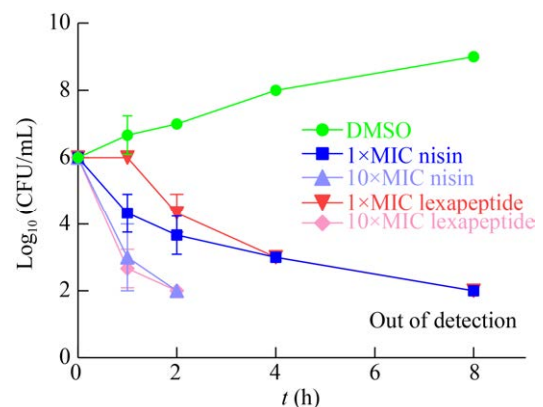


图 2 雷可肽与乳酸链球菌素的抑菌动力学曲线  
Figure 2 Antibacterial kinetic curves of lexapeptide and nisin

注: 数据源于 3 组重复实验, 误差线为标准差

Note: Data are representative of three independent experiments. Error bars show the standard deviations

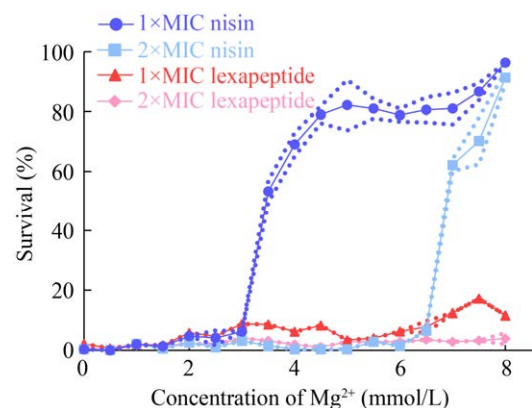


图 3 Mg<sup>2+</sup>对雷可肽抑菌活性影响

Figure 3 The effects of Mg<sup>2+</sup> on the antibacterial ability of lexapeptide

注: 数据点代表 3 次实验平均值, 点线为标准差的连线

Note: Data points are means of three independent experiments. Dotted lines connect the standard deviations

活性几乎都不受影响。(2) 在 $[Mg^{2+}] = 3-8$  mmol/L 范围内, 雷可肽仍保有大部分抗菌活性, 而  $1 \times MIC$  的乳酸链球菌素则在 $[Mg^{2+}] \geq 3.5$  mmol/L 时丧失大部分活性,  $2 \times MIC$  的乳酸链球菌素则在 $[Mg^{2+}] > 6.5$  mmol/L 时丧失大部分活性, 到 8 mmol/L 时抑菌活性都接近于零。

### 2.3 雷可肽对革兰氏阳性菌细胞通透性的影响

荧光染料 SYTOX Green 不能透过活细胞质膜, 但能进入死细胞与核酸结合并发出绿色荧光。利用这种特性, 结合分析型流式细胞仪检测雷可肽处理后的金黄色葡萄球菌是否具有通透性。与 DMSO 处理组相比, 雷可肽处理 120 min 后  $>99\%$  的细菌细胞具有强的荧光值 ( $P=0.0197 < 0.05$ ); 而雷可肽与乳酸链球菌素处理后的细胞没有显著性差异 ( $P=0.3923 > 0.05$ )。表明雷可肽处理的细胞获得了通透性, 与能在质膜上

穿孔的乳酸链球菌素效果一致(图 4)。

### 2.4 雷可肽对细胞形态的影响

在电子显微镜下观察雷可肽处理后的金黄色葡萄球菌细胞, 结果如图 5 所示。与阴性对照(A)相比, 雷可肽处理后的细胞在靠近细胞膜的局部区域失去电子密度(B), 表明细胞出现破损。随着抗生素浓度的提高, 破损情况愈发明显(C), 表明雷可肽能使革兰氏阳性菌细胞破损, 与流式细胞仪分析的结果一致。

### 2.5 雷可肽处理对肽聚糖合成前体的影响

革兰氏阳性菌细胞壁主要成分为肽聚糖。肽聚糖的生物合成途径复杂, 尿嘧啶核苷二磷酸-N-乙酰胞壁酸五肽(UDP-NAcMur-Pentapeptide)是其中的一个关键中间体(图 6A)。用  $10 \times MIC$  雷可肽处理细菌细胞, 通过高效液相色谱(HPLC)检测细胞水提物, 在保留时间 10 min 时检测出现差异

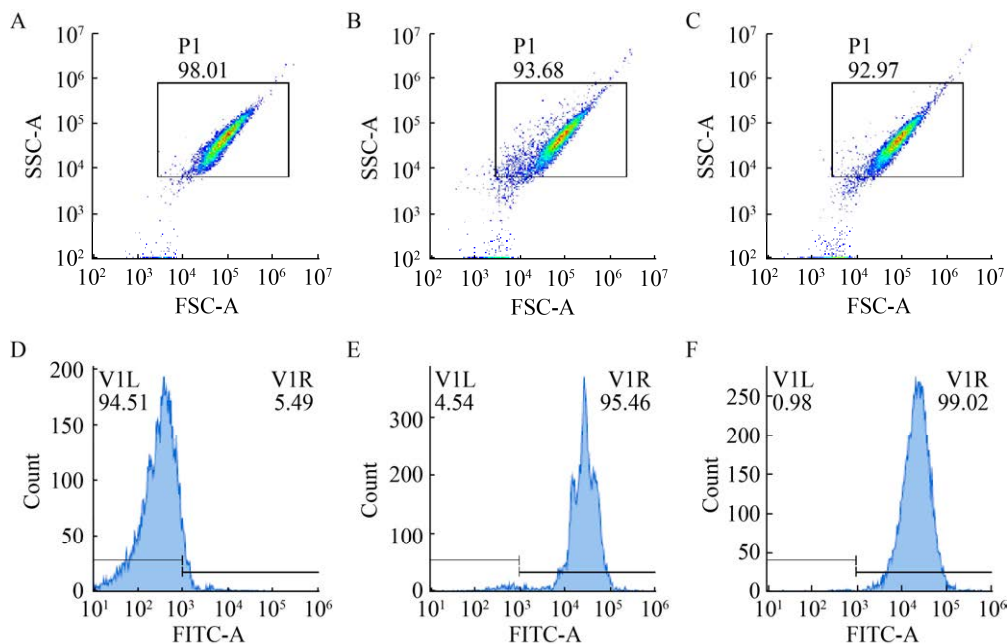


图 4 流式细胞仪检测细胞膜通透性

#### Figure 4 Detection of membrane permeability with flow cytometry

注: A、B、C: 颗粒(细菌细胞)的侧向角散射(SSC-A)对前向角散射(FSC-A)作图, 选取框线内区域进行荧光分选计数; D、E、F: 不同荧光强度颗粒的计数。A、D 为 DMSO 处理结果; B、E 为雷可肽处理结果; C、F 为乳酸链球菌素处理结果。雷可肽处理的细胞与乳酸链球菌素处理的细胞流式分析结果没有显著性差异 ( $P > 0.05$ )

Note: A, B, C are side scatter area (SSC-A) vs forward scatter area (FSC-A) plots. Border areas were selected to count the cell number of different fluorescence value. D, E, F are counts vs fluorescence plots. DMSO is the solvent of nisin (B, E) and lexapeptide (C, F) solution, served as negative control (A, D). Lexapeptide-treated cells display no significant difference with nisin-treated cells ( $P > 0.05$ )

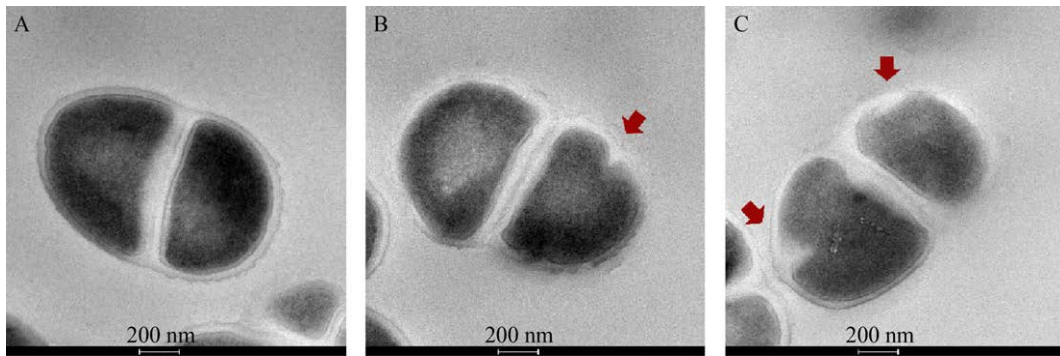


图 5 透射电镜观察雷可肽处理的金黄色葡萄球菌形态

Figure 5 Morphological observation of lexapeptide-treated *Staphylococcus aureus* with TEM

注: A: 阴性对照; B: 1×MIC 雷可肽处理后电镜结果; C: 2×MIC 雷可肽处理后电镜结果。箭头示意失去电子密度的近膜区域

Note: A: Negative control; B: 1×MIC lexapeptide-treated; C: 2×MIC lexapeptide-treated. The arrow indicates the area near the membrane where the electron density is lost

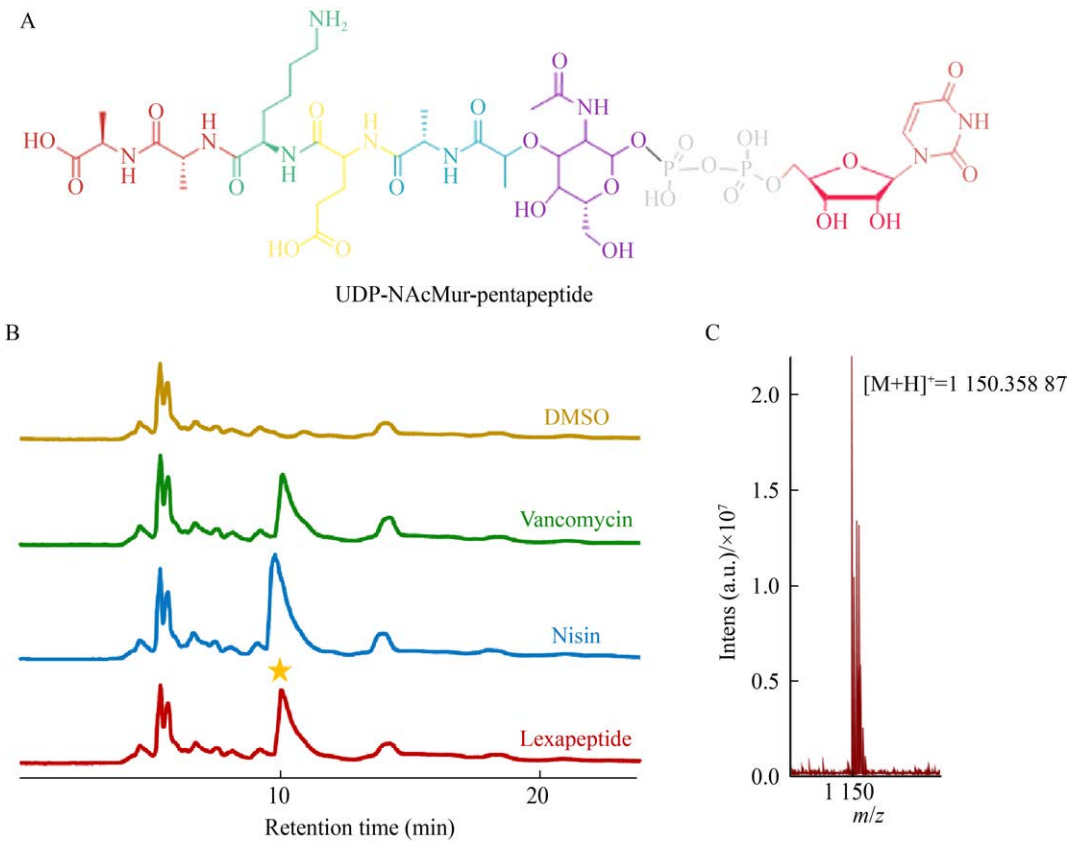


图 6 雷可肽处理细胞中肽聚糖前体物质积累检测

Figure 6 Detection of peptidoglycan precursors in lexapeptide-treated cells

注: A: 尿嘧啶核苷二磷酸 N-乙酰胞壁酸五肽; B: HPLC 检测肽聚糖前体积累, 检测条件: 210 nm, 0.6 mL/min; C: MALDI-TOF MS 分析肽聚糖前体

Note: A: Structure of UDP-NAcMur-pentapeptide; B: Profile of the accumulation of peptidoglycan precursors with HPLC (at 210 nm, 0.6 mL/min); C: Analysis of peptidoglycan precursor with MALDI-TOF MS

峰, 万古霉素和乳酸链球菌素处理的样品也积累相同的差异峰(图 6B)。经 MALDI-TOF MS 分析得到差异峰的高分辨质谱为 1 150.358 87 (图 6C), 与尿苷二磷酸-N-乙酰胞壁酸五肽分子量理论值  $([M+H]^+ = 1\ 150.359\ 42)$  一致。表明雷可肽处理抑制细胞壁肽聚糖合成, 导致细胞积累肽聚糖前体尿嘧啶核苷二磷酸-N-乙酰胞壁酸五肽。

### 3 讨论与结论

随着抗生素在几十年来的大规模使用, 大部分临床使用的抗生素都已产生耐药菌株, 如糖肽类抗生素<sup>[26]</sup>与  $\beta$ -内酰胺类抗生素<sup>[27]</sup>。乳酸链球菌素作为食品防腐剂使用长达 60 多年, 在 50 多个国家广泛应用, 在应用范围内目前仍未见大规模的耐药菌报道, 仅有部分食品腐败菌如李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)<sup>[28]</sup>和沙门氏菌 (*Salmonella*)<sup>[29]</sup> 中有报道。这种现象可以归因于乳酸链球菌素独特的杀菌抑菌机制, 其抑制细胞壁合成与膜穿孔的双重抑菌作用模式较不容易在靶细菌中产生耐药性进化。因此开发类似作用机制的新型羊毛硫细菌素药物具有明显优势<sup>[30]</sup>。

前期研究表明雷可肽具有优于乳酸链球菌素的抑菌活性 (MIC 值更低)<sup>[15]</sup>。除藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) 对乳酸链球菌素异常敏感外, 雷可肽对已测试的革兰氏阳性菌株的抑菌活性均强于乳酸链球菌素, 根据 MIC 判断雷可肽对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、分枝杆菌等的抑菌活性为乳酸链球菌素的 2–10 倍<sup>[15]</sup>。此外, 本研究在检测  $Mg^{2+}$  对抑菌活性影响时发现, 雷可肽和乳酸链球菌素分别在 0.0–8.0 mmol/L 和 0.0–3.5 mmol/L  $Mg^{2+}$  范围内保持较强抑菌活性, 提示雷可肽在更大  $Mg^{2+}$  浓度范围适用。 $Mg^{2+}$  广泛存在于自然环境中, 是生物体内第 4 丰富的阳离子, 在哺乳动物细胞内总  $Mg^{2+}$  浓度高达 30 mmol/L (其中游离  $Mg^{2+}$  约为 0.1–0.5 mmol/L), 在植物组织中含量更高<sup>[31]</sup>。因此, 在药物、食品、饲料等领域雷可肽

可能具有更广泛的适用场景。

本研究通过抑菌动力学曲线绘制、流式细胞仪检测、电镜观察和肽聚糖合成前体积聚检测对雷可肽抑菌机制进行了初步研究。针对对数生长期的金黄色葡萄球菌, 雷可肽与乳酸链球菌素在抑菌动力学没有显著差异。流式细胞分析表明雷可肽处理后的细胞具有了通透性, 能够使核酸染料通过; 结合电镜的形态学观察, 表明雷可肽能使革兰氏阳性细菌细胞壁膜具有通透性。高效液相色谱检测到雷可肽处理后的细菌提取物相对于空白对照组有差异峰, 经 MALDI-TOF MS 分析差异组分为 UDP-N 乙酰胞壁酸五肽, 表明雷可肽能够抑制革兰氏阳性细菌细胞壁合成, 致使肽聚糖合成前体在体内积累。上述结果表明, 雷可肽很有可能也具有与乳酸链球菌素相似的 2 种抑菌作用模式, 即抑制细胞壁合成和细胞膜穿孔。

晶体结构显示乳酸链球菌素 A 环的 Ala3、Ile4 和 Dhb5 及其周边残基 (Dhb2 和 Abu8) 肽链骨架通过氢键与 Lipid II 的焦磷酸互作而抑制细胞壁合成<sup>[9]</sup>。雷可肽分子结构与乳酸链球菌素差别较大<sup>[15]</sup>, 2 个相距较远 (10 aa) 的含硫桥环 (羊毛硫氨酸环和 AviMeCys 环) 中哪个环参与抑制肽聚糖合成, 是否通过与 Lipid II 结合或与肽聚糖合成途径其他靶点结合, 均有待后续深入探索。另外, 羊毛硫肽尾部结构在其抑菌作用上也起着至关重要的作用, 乳酸链球菌素 C 端 6 个 aa (Ser29–Lys34) 长的带有正电荷的尾部能够帮助其插入带有负电荷的细胞膜中<sup>[10,32]</sup>。雷可肽的尾部由 18 个氨基酸残基组成, 是乳酸链球菌素尾部的 3 倍长, 尾部伸展的长度更接近细胞膜的厚度, 这种特殊结构极有可能赋予了雷可肽在细胞膜内侧更强的穿孔作用。

综上, 本研究发现雷可肽在较宽的  $Mg^{2+}$  浓度范围保持较强抑菌活性, 明确了雷可肽通过抑制细胞壁合成和细胞膜穿孔 2 种抑菌模式抑制靶细菌, 为雷可肽抑菌的分子机理研究奠定基础。



致谢:感谢上海交通大学分析与测试中心王戈老师在电镜样品制备上给予的指导与帮助,感谢上海交通大学生命科学技术学院生命开放平台蒋海霞老师在流式细胞仪使用上给予的支持与帮助。

## REFERENCES

- [1] Chatterjee C, Paul M, Xie LL, Van Der Donk WA. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics[J]. *Chemical Reviews*, 2005, 105(2): 633-684
- [2] Bauer R, Dicks LMT. Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 101(2): 201-216
- [3] McAuliffe O, Ross RP, Hill C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2001, 25(3): 285-308
- [4] Rogers LA. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1928, 16(5): 321-325
- [5] Epand RM, Epand RF. Bacterial membrane lipids in the action of antimicrobial agents[J]. *Journal of Peptide Science*, 2011, 17(5): 298-305
- [6] Breukink E, De Kruijff B. Lipid II as a target for antibiotics[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2006, 5(4): 321-332
- [7] Wiedemann I, Breukink E, Van Kraaij C, Kuipers OP, Bierbaum G, De Kruijff B, Sahl HG. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(3): 1772-1779
- [8] Abee T, Rombouts FM, Hugenholtz J, Guihard G, Letellier L. Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(6):1962-1968
- [9] Hsu STD, Breukink E, Tischenko E, Lutters MAG, De Kruijff B, Kaptein R, Bonvin AMJJ, Van Nuland NAJ. The nisin-lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics[J]. *Nature Structural and Molecular Biology*, 2004, 11(10): 963-967
- [10] Medeiros-Silva J, Jekhmane S, Paioni AL, Gawarecka K, Baldus M, Swiezewska E, Breukink E, Weingarth M. High-resolution NMR studies of antibiotics in cellular membranes[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 3963
- [11] Pokhrel R, Bhattarai N, Baral P, Gerstman BS, Park JH, Handfield M, Chapagain PP. Molecular mechanisms of pore formation and membrane disruption by the antimicrobial lantibiotic peptide Mutacin 1140[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2019, 21(23): 12530-12539
- [12] Vestergaard M, Berglund NA, Hsu PC, Song C, Koldsø H, Schjøtt B, Sansom MSP. Structure and dynamics of cinnamycin-lipid complexes: mechanisms of selectivity for phosphatidylethanolamine lipids[J]. *ACS Omega*, 2019, 4(20): 18889-18899
- [13] Brötz H, Bierbaum G, Reynolds PE, Sahl HG. The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan biosynthesis at the level of transglycosylation[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1997, 246(1): 193-199
- [14] Xu M, Wang YM, Zhao ZL, Gao GX, Huang SX, Kang QJ, He XY, Lin SJ, Pang XH, Deng ZX, et al. Functional genome mining for metabolites encoded by large gene clusters through heterologous expression of a whole-genome bacterial artificial chromosome library in *Streptomyces* spp.[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(19): 5795-5805
- [15] Xu M, Zhang F, Cheng Z, Bashiri G, Wang J, Hong JL, Wang YM, Xu LJ, Chen XF, Huang SX, et al. Functional genome mining reveals a class V lanthipeptide containing a D-amino acid introduced by an F<sub>420</sub>H<sub>2</sub>-dependent reductase[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(41): 18029-18035
- [16] Arnison PG, Bibb MJ, Bierbaum G, Bowers AA, Bugni TS, Bulaj G, Camarero JA, Campopiano DJ, Challis GL, Clardy J, et al. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature[J]. *Natural Product Reports*, 2013, 30(1): 108-160
- [17] Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(2): 163-175
- [18] Lee W, Schaefer K, Qiao Y, Srisuknimit V, Steinmetz H, Müller R, Kahne D, Walker S. The mechanism of action of lysobactin[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(1): 100-103
- [19] Martin JK, Sheehan JP, Bratton BP, Moore GM, Mateus A, Li SHJ, Kim H, Rabinowitz JD, Typas A, Savitski MM, et al. A dual-mechanism antibiotic kills Gram-negative bacteria and avoids drug resistance[J]. *Cell*, 2020, 181(7): 1518-1532.e14
- [20] Lebaron P, Catala P, Parthuisot N. Effectiveness of SYTOX Green stain for bacterial viability assessment[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(7): 2697-2700
- [21] Barbour A, Tagg J, Abou-Zied OK, Philip K. New insights into the mode of action of the lantibiotic salivaricin B[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 31749
- [22] Ling LL, Schneider T, Peoples AJ, Spoering AL, Engels I, Conlon BP, Mueller A, Schäberle TF, Hughes DE, Epstein S, et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance[J]. *Nature*, 2015, 517(7535): 455-459
- [23] Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik B,

- Schaechter M, Umbarger HE. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology[U]. Washington: American Society for Microbiology, 1987
- [24] Houlihan AJ, Russell JB. The effect of calcium and magnesium on the activity of bovicin HC<sub>5</sub> and nisin[J]. *Current Microbiology*, 2006, 53(5): 365-369
- [25] Stevens KA, Sheldon BW, Klapes NA, Klaenhammer TR. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(12): 3613-3615
- [26] Stogios PJ, Savchenko A. Molecular mechanisms of vancomycin resistance[J]. *Protein Science*, 2020, 29(3): 654-669
- [27] Kim B, Hwang H, Kim J, Lee M J, Pai H. Ten-year trends in antibiotic usage at a tertiary care hospital in Korea, 2004 to 2013[J]. *Korean Journal of Internal Medicine*, 2020, 35(3): 703-713
- [28] Wambui J, Eshwar AK, Aalto-Araneda M, Pöntinen A, Stevens MAJ, Njage PMK, Tasara T. The analysis of field strains isolated from food, animal and clinical sources uncovers natural mutations in *Listeria monocytogenes* nisin resistance genes[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 549531
- [29] De Freitas LL, Dos Santos CIA, Carneiro DG, Vanetti MCD. Nisin and acid resistance in *Salmonella* is enhanced by N-dodecanoyl-homoserine lactone[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 147: 104320
- [30] Sandiford SK. An overview of lantibiotic biosynthetic machinery promiscuity and its impact on antimicrobial discovery[J]. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2020, 15(3): 373-382
- [31] Wolf FI, Cittadini A. Chemistry and biochemistry of magnesium[J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2003, 24(1/3): 3-9
- [32] Fael H, Demirel AL. Nisin/polyanion layer-by-layer films exhibiting different mechanisms in antimicrobial efficacy[J]. *RSC Advances*, 2020, 10(17): 10329-10337