

· 研究论文 ·

人工设计抗菌肽Amphilysin-K20的体外抗菌活性及作用机制研究

王凤¹ 杨小艳¹ 王诗烨¹ 杨敏¹ 朱露瑶¹ 黄嘉滢¹ 吴宁榕¹ 张怀东¹ 李芹^{1,2*}

(福建师范大学, 生命科学学院, 福州 350000; ²福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 厦门 361021)

摘要 细菌耐药性问题日益严峻, 开发新型抗菌肽具有重要意义。该研究旨在理性设计一种高效低毒的抗菌肽, 并探究其抗菌机制。基于(XXYY)_n模板, 通过协同优化策略构建了含8个正电荷的两亲性 α -螺旋抗菌肽Amphilysin-K20, 采用体外抗菌实验(包括MIC、MBC及时间杀灭曲线)、细胞毒性检测、溶血实验、电镜观察和分子动力学模拟等方法系统评价其活性与机制。结果表明, 该肽对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均具有强效杀菌活性, MBC/MIC值均 ≤ 2 , 并能在150 min内实现浓度依赖性快速杀菌。电镜与分子动力学模拟结果显示: Amphilysin-K20通过破坏细菌细胞膜完整性发挥快速杀菌作用; 其在16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下对HaCaT细胞毒性低(细胞活力 $>90\%$), 溶血率仅为1.39%, 生物安全性良好。综上, 该研究通过骨架-两端协同优化的理性策略设计获得了新型抗菌肽Amphilysin-K20, 其膜靶向的快速杀菌机制及良好的生物相容性为抗菌肽设计提供了理论基础, 也为应对日益严峻的细菌耐药性问题提供了具有开发潜力的候选分子。

关键词 抗菌肽Amphilysin-K20; 抗菌活性; 生物安全性; 作用机制

Study on *In Vitro* Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Artificially Designed Antimicrobial Peptide Amphilysin-K20

WANG Feng¹, YANG Xiaoyan¹, WANG Shiye¹, YANG Min¹, ZHU Luyao¹, HUANG Jiaying¹, WU Ningrong¹,
ZHANG Huaidong¹, LI Qin^{1,2*}

(College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350000, China;

²Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen 361021, China)

Abstract The problem of bacterial resistance is becoming increasingly severe, and the development of novel AMPs (antimicrobial peptides) is of great significance. This study aimed to rationally design an AMP with high efficacy and low toxicity, and explore its antibacterial mechanism. Based on the (XXYY)_n template, an amphiphilic α -helical antimicrobial peptide Amphilysin-K20 carrying eight positive charges was constructed through a synergistic optimization strategy. A series of methods including *in vitro* antibacterial experiments MIC (minimum

收稿日期: 2025-08-15 接受日期: 2025-11-14

福建省自然科学基金(批准号: 2024J011257)、福州市卫生健康中青年人才科研项目(批准号: 2024-S-rc1)和福建省食品微生物与酶工程重点实验室开放基金(批准号: Z823280-7)资助的课题

*通信作者。Tel: 0591-22868195, E-mail: liqin@fjnu.edu.cn

Received: August 15, 2025 Accepted: November 14, 2025

This work was supported by the Fujian Provincial Natural Science Foundation (Grant No.2024J011257), the Fuzhou Health Commission Research Project for Young and Middle-Aged Talents (Grant No.2024-S-rc1), and the Open Fund Project of Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering (Grant No.Z823280-7)

*Corresponding author. Tel: +86-591-22868195, E-mail: liqin@fjnu.edu.cn

inhibitory concentration), MBC (minimum bactericidal concentration), and time-kill curves, cytotoxicity assay, hemolysis test, electron microscopy observation, and molecular dynamics simulation were employed to systematically evaluate its activity and mechanism. The results showed that this peptide exhibits potent bactericidal activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, with a MBC to MIC ratio of ≤ 2 . Moreover, it achieves concentration-dependent rapid bactericidal effects within 150 min. Results from electron microscopy and molecular dynamics simulations revealed that Amphilysin-K20 exerts its rapid bactericidal action by disrupting the integrity of bacterial cell membranes. At a concentration of 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, it displayed low cytotoxicity toward HaCaT cells (cell viability $>90\%$) and a hemolysis rate of only 1.39%, indicating excellent biosafety. In conclusion, this study successfully designed a novel antimicrobial peptide, Amphilysin-K20, through a rational “backbone-terminal” synergistic optimization strategy. Its membrane-targeted rapid bactericidal mechanism and favorable biocompatibility not only provide a theoretical basis for antimicrobial peptide design but also offer a promising candidate molecule for addressing the increasingly severe issue of bacterial resistance.

Keywords antimicrobial peptide Amphilysin-K20; antibacterial activity; biosafety; mechanism of action

20世纪初,细菌感染性疾病(如结核病)是全球人口死亡的主要诱因之一。抗生素的发现与应用彻底改变了这一格局——不仅有效控制了细菌感染,推动了抗感染治疗领域实现革命性突破,更通过降低感染相关死亡率显著延长了人类平均寿命^[1]。然而,随着抗生素在人类疾病治疗、动物疫病防控及保健饲养中的不当使用乃至过度滥用,细菌耐药性问题日益严峻,导致其临床疗效持续下降^[2-4]。*The Lancet*最新全球分析显示,2025至2050年间,抗微生物药物耐药菌感染可能导致全球超3 900万人死亡^[5],问题发展趋势十分紧迫。与此同时,新型抗生素的研发陷入瓶颈:天然来源抗生素的挖掘及成药进程几近停滞,尽管合成生物学与高通量筛选技术加速了化合物的发现,但成药转化率仍极低。世界卫生组织(World Health Organization, WHO)2024年报告指出,当前处于临床开发阶段的新型抗生素不足50种,且超80%因毒性、耐药性或疗效不足在临床前或早期临床阶段终止^[6],这进一步加剧了抗感染治疗的临床困境。

在此背景下,抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)作为一类兼具广谱抗菌活性与独特作用机制的生物分子,成为抗感染领域的研究热点^[7]。其作用机制可分为膜靶向与非膜靶向两大类。在膜靶向机制中,AMPs通过桶状孔模型(barrel-stave)^[8-9]、地毯模型(carpet model)^[10]及去污剂模型(detergent-like model)^[11]破坏细菌细胞膜完整性。具体而言,在桶状孔模型中,AMPs插入膜结构形成跨膜孔道导致胞内容物外泄^[12];在地毯模型中,AMPs在膜表面达到

临界浓度后形成“地毯”状结构瓦解膜完整性^[13];在去污剂模型中,AMPs则通过与膜脂质的相互作用使膜结构解体^[14]。在非膜靶向机制^[15]中,部分AMPs可通过抑制核酸合成^[16-17]、调控宿主免疫(如趋化免疫细胞)或阻断病原体入侵等途径对病原菌最终的成功感染造成影响^[18-19]。此外,AMPs与抗生素的联合应用可实现“减抗增效”——例如,作为AMPs的多黏菌素与头孢他啶联用可治疗耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(carbapenem-resistant *Enterobacteriales*, CRE)引起的尿路感染^[20];AMPs与万古霉素联用能破坏细胞膜屏障,协助万古霉素进入胞内以克服渗透障碍^[21],这类协同效应已在临床中展现应用价值^[22-24]。

尽管APMs具有显著潜力,但其来源与制备方式的不同导致它们在性能、生产及应用潜力上存在显著差异:天然AMPs虽经进化筛选具备良好的病原体选择性,部分还可调控宿主免疫^[25],但普遍存在提取成本高、产率低及体内生物稳定性差、半衰期短的问题^[26-28];工程表达AMPs虽可一定程度解决提取难题,并能通过密码子优化提升表达量,但却往往受限于抗菌肽对宿主细胞的毒性导致的表达效率低、纯化成本高,以及难以进行非天然氨基酸修饰等短板^[29]。相比之下,人工设计合成AMPs不仅可通过分子结构改造或借助AI技术来优化性能,还兼具生产周期短、纯度高且易控及可灵活进行化学修饰的突出优势,因而能针对性地改进前两类AMPs的不足^[30]。

正因如此,鉴于天然抗菌肽可能活性不足、工程表达肽又改造灵活性受限,本研究最终选择采用人工设计合成策略。我们基于 $(\text{XXYY})_n$ 模板,通过

“骨架-两端”协同优化方法, 精准调控并设计得到电荷+8、疏水残基占比60%的Amphilysin-K20, 旨在研究其体外抗菌性能及作用机制。本研究通过系统的体外实验综合评价其抗菌性能, 结合电镜观察其对细菌细胞膜结构的损伤效应, 并借助分子动力学模拟技术, 在分子水平上解析了其与细菌膜磷脂成分1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸甘油[1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol), POPG]的动态互作过程, 旨在从多尺度阐明其杀菌机制。本研究旨在解决“高活性与低毒性难以平衡”的关键问题, 不仅为新型抗菌肽研发提供了可复制的设计思路, 也为阐明Amphilysin-K20的结构与功能关系及基于膜靶向机制的抗菌肽理性设计提供了坚实的实验依据和理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株 本研究选用5株标准菌株, 包括革兰氏阳性菌: 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)(ATCC29213)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii*, *B. subtilis* subsp. *Spizizenii*)(ATCC6633); 革兰氏阴性菌: 大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)(ATCC25922)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, *A. baumannii*)(ATCC19606)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa*)(ATCC27853), 所有菌株均为本实验室保存。

1.1.2 细胞 人永生化角质形成细胞(HaCat)购自中国科学院细胞库, 用于评估抗菌肽的哺乳动物细胞毒性。

1.1.3 抗菌肽 抗菌肽Amphilysin-K20(氨基酸序列: GILRKFKKVFKKIKRLWILA)由生工生物工程(上海)股份有限公司采用固相合成法合成, 并通过反相高效液相色谱法纯化。本研究共使用了3个独立合成批次的多肽。每一批次产物均经严格质检: 反相高效液相色谱检测显示纯度均>98%, 质谱验证其分子质量与理论值(2 486.19 Da)偏差小于0.10 Da[实测值(2 486.19±0.05) Da]。此外, 所有批次在用于正式实验前, 均通过了针对全部测试菌株的抗菌活性验证[最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)测定], 结果显示其MIC值完全一致, 确保了抗菌活性的批次间稳定性与实验数据的可靠性。

1.1.4 主要试剂及仪器 主要试剂: 胰蛋白胨、酵母提取物、碘化丙啶(propidium iodide, PI)、琼脂粉购自生工生物工程(上海)股份有限公司; Triton X-100、电镜固定液(2.5%戊二醛)购自武汉赛维尔生物科技有限公司; CCK-8细胞毒性试剂盒购自上海碧云天生物技术股份有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。

主要仪器: 超净工作台(SW-CJ-IFD, 安泰空气技术有限公司)、荧光显微镜(DMI8-DFC450C, 上海徕卡显微系统有限公司)、酶标仪(Readmax, 上海闪谱生物科技有限公司)、恒温培养摇床(ZWY-2112B, 上海智城分析仪器制造有限公司)、培养箱(GNP-9050, 上海精宏实验设备有限公司)、台式离心机(TGL-16M, 上海卢湘仪离心机仪器有限公司)。扫描电子显微镜(SU8100)、透射电子显微镜(HT7800)均来自日立科学仪器(北京)有限公司。

1.2 抗菌肽的分子设计与生物信息学分析

1.2.1 抗菌肽的分子设计 根据WIRADHARMA等^[31]创建的 α -螺旋肽模板(XXYY)_n(X为疏水残基, Y为阳离子残基, $n=2\sim 4$, n 为重复单元数), 本研究以XXYY为核心骨架, 结合JIA等^[32]关于“重复序列优化调控抗菌肽构象与选择性”的设计理念, 引入XY重复单元开展分子设计, 通过“骨架-两端”协同优化实现电荷与疏水性的功能协同, 具体设计流程如下。

核心骨架优化: 在XXYY模板基础上, 设置2个XXYY重复单元以及2个XY重复单元(总组合序列为XXYY-XYY-XXYY-XYY), 通过对称重复序列平衡抗菌活性与宿主膜毒性的策略, 核心优化步骤如下: 将赖氨酸(Lys, K)、精氨酸(Arg, R)等共8个阳离子残基引入序列, 构建基础序列模板为“G-XXYY-XY-XXYY-XYY-XXXX”。其中, Arg的胍基与Lys的氨基可通过双齿氢键及强静电作用, 与细菌膜外叶的阴离子磷脂(如脂多糖LPS)特异性结合; 同时利用细菌膜外叶阴离子磷脂的负电荷特性, 实现肽链对细菌膜的靶向引导, 为后续膜插入作用奠定基础^[32]。

进一步, 通过调整异亮氨酸(Ile, I)、亮氨酸(Leu, L)等疏水残基的空间分布, 控制疏水残基占比达60%, 构建有序的亲疏水界面——使阳离子残基的“靶向引导”与疏水残基的“膜插入破坏”功能协同起效, 通过亲疏水界面的有序排布降低非特异性作用。

针对哺乳动物宿主膜外叶以两性离子磷脂为主且富含胆固醇的结构特征^[33], 本研究通过“XXYY(高疏水)-XYY(中疏水)”的重复单元组合, 避免肽链因过度疏水与宿主膜发生非特异性结合, 从而提升肽链的膜选择性。

两端结构修饰: 为保障核心骨架的功能稳定性, 对肽链两端进行针对性修饰。N-端修饰: 引入甘氨酸(Gly, G), 利用其侧链仅为氢原子的结构特点增强肽链柔性, 减弱肽链与宿主膜的非特异性相互作用, 同时提升肽链在水环境中的扩散能力; C-端修饰: 引入丙氨酸(Ala, A), 利用其 α -螺旋倾向残基的特性稳定肽链的 α -螺旋构象。通过上述设计, 最终获得目标抗菌肽, 并将其命名为Amphilysin-K20, 其氨基酸序列为GILRKFKKVFKKIKRLWILA, 该肽链作为后续抗菌功能验证、作用机制解析及膜选择性评价的核心多肽材料。

1.2.2 抗菌肽的生物信息学分析 采用在线工具对Amphilysin-K20的理化性质及结构特性进行预测分析。

理化性质预测: 通过PotParam工具(<http://web.expasy.org/protparam/>)计算多肽的分子质量、理论等电点(isoelectric point, pI)、总平均亲水性(GRAVY值)、氨基酸组成及不稳定性系数等参数。

二级结构预测: 利用AlphaFold2在线平台(<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/AlphaFold2>)预测多肽二级结构。

螺旋特征分析: 通过HeliQuesT工具(<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>)绘制螺旋轮图, 分析多肽的两亲性分布、疏水力矩及电荷分布特征。

1.3 抗菌肽的抗菌活性与安全性评价

1.3.1 最小抑菌浓度和最小杀菌浓度的测定 采用微量稀释法^[34]测定抗菌肽的MIC, 挑取单克隆测试菌菌落接种于LB液体培养基, 37 °C振荡培养至对数生长期($D_{600}\approx 0.6$), 以LB液体培养基稀释菌液至 1×10^5 CFU/mL。在96孔板中对抗菌肽浓度进行二倍梯度稀释(256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5 μ g/mL), 每孔加入50 μ L稀释好的肽溶液与50 μ L菌液(终菌量 5×10^4 CFU/孔), 设置细菌生长对照(50 μ L菌液+50 μ L LB)和空白对照(100 μ L LB)。37 °C培养24 h后, 以“与空白对照相比完全澄清”的最小浓度为MIC。

取MIC测定中澄清孔的培养物, 10倍系列稀释

后取100 μ L涂布LB平板, 37 °C培养10~12 h, 以“菌落数均值<5个”的最小浓度为最小杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)。

1.3.2 时间杀灭曲线 通过时间杀灭试验^[35]研究抗菌肽对不同细菌的杀菌效果: 测试菌株经37 °C、220 r/min LB培养基振荡培养至对数期($D_{600}=0.4\sim 0.6$), 稀释100倍后, 分别加入1× MIC、2× MIC、4× MIC的抗菌肽(试验组), 以未加肽的菌液为空白对照, 37 °C恒温培养。分别于0、30、60、90、120、150 min取样, 取100 μ L涂布LB琼脂平板, 确保同一稀释度下3个平行平板的计数误差<15%, 培养10~12 h后计算菌落形成单位(colony forming unit, CFU)。

1.3.3 抗菌肽的细胞毒性测定 采用CCK-8法: HaCat细胞培养于含100 U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素的DMEM高糖培养基中, 置于37 °C、5% CO₂加湿培养箱。将细胞以 5×10^3 孔接种于96孔板, 于37 °C、5% CO₂加湿培养箱中过夜孵育; 待细胞贴壁后, 加入终浓度为8、16、32、64、128 μ g/mL的抗菌肽, 在上述条件下孵育1 h^[36]; 每孔加10 μ L CCK-8溶液, 继续在37 °C、5% CO₂加湿培养箱孵育1.5 h, 酶标仪测定 D_{450} , 计算细胞活力。

细胞活力=[$D_{(\text{实验组})}-D_{(\text{空白对照组})}$]/[$D_{(\text{阴性对照组})}-D_{(\text{空白对照组})}$]×100%。 D (实验组): 含细胞、培养基、CCK-8溶液和抗菌肽的孔的 D 值; D (阴性对照组): 含细胞、培养基、CCK-8溶液但无抗菌肽的孔的 D 值; D (空白对照组): 含培养基、CCK-8溶液但无细胞和抗菌肽的孔的 D 值。

1.3.4 抗菌肽的溶血性测定 参照文献[37]方法: 取兔成熟红细胞, 经0.9%生理盐水洗涤3次(至上清无色透明), 制备8%(V/V)红细胞悬液。采用二倍梯度稀释法将抗菌肽稀释为512、256、128、64、32、16、8、4、2、1 μ g/mL。取50 μ L 8%红细胞悬液与50 μ L梯度浓度抗菌肽溶液, 加入2.0 mL离心管, 37 °C静置孵育1 h; 室温下2 000 r/min离心5 min, 取100 μ L上清转移至96孔板, 酶标仪检测波长在540 nm处的吸光度值。

测定结果以生理盐水和0.1% Triton X-100紫外吸光值分别为0%和100%溶血对照, 溶血度计算公式如下: 溶血度=[(抗菌肽吸光值-生理盐水吸光值)/(Triton X-100吸光值-生理盐水吸光值)]×100%。

1.3.5 统计学分析 所有需进行数据分析的实验均独立重复3次, MIC/MBC取几何均值。实验结果

以均值±标准误(mean±SEM)表示, 组间(对照组与实验组)差异显著性采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行检验, 其中ns表示差异不显著, $*P<0.05$ 表示差异具有统计学显著性, $****P<0.0001$ 表示差异极显著。

1.4 抗菌肽的抗菌机制研究

1.4.1 抗菌肽处理测试菌的扫描及透射电镜表征
扫描电镜和透射电镜的前处理方法相同。参照文献[38]中的方法, 将培养至对数生长期的 *E. coli* 用无菌生理盐水调整菌浓度为 10^6 CFU/mL, 实验组为浓度为 $2\times$ MIC 的抗菌肽溶液处理组, 对照组以等体积 PBS 代替抗菌肽溶液。各组样品于 37°C 摆床中 220 r/min 孵育 1 h, 取菌液于 4°C 、 $4\,000\text{ r/min}$ 离心 5 min, 弃上清, 无菌 PBS 洗涤 3 次后收集沉淀, 用电镜固定液将沉淀重悬, 放入 4°C 冰箱静置固定 2 h, 低温保存送样至北京星梦格检测科技有限公司进行后续样品处理及电镜数据获取。

1.4.2 抗菌肽与细菌模型膜 POPG 互作机制的分子动力学模拟
体系构建: 采用 VMD 进行可视化及初始建模, 借助 GROMACS 开展分子动力学模拟。通过 AlphaFold2 平台预测抗菌肽三维结构并导出 PDB 文件, 用于后续模拟。利用 CHARMM-GUI 在线平台 (<https://charmm-gui.org/>) 构建细菌膜模型 (POPG 膜): 设置膜体系为全原子模型, 水分子厚度 2.25 nm , 水溶液含 0.15 mol/L NaCl 以模拟生理离子环境; 磷脂分子力场选用平台提供的 CHARMM36 力场, 确保膜结构与动力学行为的准确性。

模拟过程: 模拟前对 POPG 膜进行平衡模拟: 将其放入 $10\text{ nm}\times10\text{ nm}\times18\text{ nm}$ 长方体盒, 依次添加水和离子模型。先以最大步数 $10\,000$ 进行能量最小化, 目标能量 $<1\,000.0\text{ kcal/mol}$; 再以 0.002 ps 步长、 $250\,000$ 步进行 NVT 平衡 (310 K), 使体系达恒温恒容热平衡; 接着以同时间步长、步数分阶段进行 NPT 平衡 (310 K , 1.0 bar , 半各向异性压力耦合), 对脂质分子依次施加 $1\,000$ 、 400 、 200 、 $40\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$ 的梯度位置限制并逐步减弱; 最后在 310 K 、 1 bar 下, 以 0.002 ps 步长进行 $50\,000\,000$ 步 (100 ns) 分子动力学 (molecular dynamics, MD) 模拟, 提取稳定帧作为后续模型。将平衡后的 POPG 膜与抗菌肽结合 (肽距膜表面 4 nm 中心处), 去除重叠水分子, 体系置于同规格盒中, 加 0.15 mol/L Na^+ 和 Cl^- 平衡电荷。随后重复能量最小化、NVT (310 K)、NPT (310 K , 1.0 bar , 限制

力 $1\,000\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$) 及 MD 模拟, 每 $10\,000$ 步输出构象, 模拟后处理轨迹并提取数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 Amphilysin-K20 的基本理化性质及二级结构预测

基于 1.2.1 中所述的“骨架-两端协同优化”的分子设计方法构建的潜在抗菌肽, 其氨基酸序列为 GILRKFKKVFKKIKRLWILA 的潜在抗菌肽。因该肽依赖两亲性 α -螺旋结构发挥作用、由 20 个氨基酸组成且富含赖氨酸 (K), 故将其命名为 Amphilysin-K20。本部分通过结构预测、理化分析与两亲性表征, 系统验证该肽的结构特征是否匹配设计目标, 为后续抗菌功能与膜选择性评价提供理论支撑。

采用 AlphaFold2 工具对 Amphilysin-K20 的二级结构进行预测, 结果如图 1A 所示: 该肽整体呈现连续的 α -螺旋结构, 且预测置信度 (predicted local distance difference test, pLDDT) 大于 90 的残基占比达 85% (pLDDT > 90 为 AlphaFold2 定义的极高可靠区间)。这一结果与设计中遵循的核心骨架优化——通过 XXYY-XYY 重复单元减少肽链内部空间位阻, 结合 C-端 Ala 修饰利用其 α -螺旋倾向残基特性稳定构象的设计目标高度契合。高置信度的 α -螺旋结构证明, 通过重复单元组合与末端修饰的协同作用, 构建了有效的 α -螺旋肽链折叠体系, 为后续“疏水区插入细菌膜、亲水区靶向结合”的功能协同提供了稳定构象基础。

通过 ExPASy-ProParam 在线工具对 Amphilysin-K20 的基本理化性质进行分析可知: 该肽由 9 种共 20 个氨基酸组成。其分子量约为 $2\,486.22\text{ Da}$, 适宜的小分子质量有助于肽链穿透细菌膜屏障。该设计抗菌肽的 pI 为 12.05 , 可确保肽链通过静电作用与细菌膜外叶的阴离子磷脂 (如 LPS) 高效结合, 验证了“靶向性设计”的合理性。在代谢稳定性方面, 该肽在哺乳动物细胞、酵母及大肠杆菌中的半衰期分别为 30 h 、 20 h 、 10 h , 表明其在真核生物体内的代谢稳定性更高, 可降低后续体内应用时的快速降解风险。此外, 该肽的不稳定性系数为 $34.52 (<40)$, 符合 ProtParam 标准判定的“稳定蛋白”范畴; 总亲水性平均系数 (GRAVY) 为 0.140 (接近中性), 适宜的亲水性可避免肽链在水环境中过度聚集, 为其扩散并接近细菌提供有利条件。

通过HeliQuest在线工具生成的螺旋轮图(图1B)显示,Amphilysin-K20呈现典型的两亲性结构,其平均疏水性(0.495)、疏水矩(0.628)与净电荷(+8)符合通过亲疏水界面实现靶向与插入协同的设计初衷。该图清晰地展示了其亲水性氨基酸(蓝色)与疏水性氨基酸(黄色)分别集中于螺旋两侧的有序空间分布:亲水侧用于结合细菌膜负电荷,而疏水侧则负责插入膜脂双层。此外,其疏水残基分布均匀,无局部聚集现象,与通过XXYY(高疏水)结合XYY(中疏水)重复单元组合避免过度疏水的设计目标匹配,可抑制肽链与哺乳动物宿主膜(两性离子磷脂为主)的非特异性结合,为后续膜选择性提升提供结构基础。

同时,末端修饰功能也得到有效验证:N-端Gly(第1位氨基酸)因侧链仅为氢原子具备高柔韧性,位于亲水区边缘,在水环境中可使肽链保持“可塑构象”,既提升扩散效率,又能在接触细菌膜时驱动肽链快速折叠为稳定 α -螺旋;C-端Ala(第20位氨基酸)以甲基侧链收尾,位于疏水区末端,既延续疏水区特性、与中间Ile、Leu等疏水残基协同稳固 α -螺旋疏水界面,又通过短小侧链避免空间位阻,维持螺旋结构完整性,确保抗菌肽在膜上持续发挥作用。

综上,Amphilysin-K20的二级结构(高稳定 α -螺旋)、基本理化性质(强碱性、高稳定性)及两亲性特

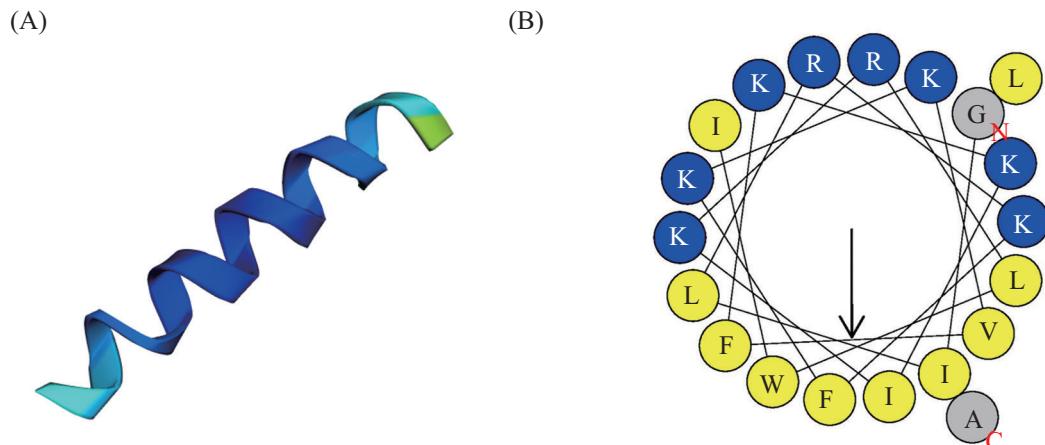
征(有序分布、净电荷+8),均与本工作分子设计目标一一对应,为后续抗菌功能验证与膜选择性评价奠定了坚实的结构与理化基础。

2.2 抗菌活性与安全性评价

2.2.1 抗菌肽MIC和MBC测定结果 为考察抗菌肽的抗菌性能,采用微量稀释法分别测定了抗菌肽Amphilysin-K20对革兰氏阴性菌(*E. coli*、*A. baumannii*、*P. aeruginosa*)和革兰氏阳性菌(*B. subtilis* subsp. *Spizizenii*、*S. aureus*)的MIC和MBC,结果如表1所示。根据文献标准[39],当肽的MBC/MIC值 ≤ 4 时可判定为杀菌型抗菌肽。在本研究中,*E. coli*、*A. baumannii*、*P. aeruginosa*的MBC/MIC值分别为:1.33、1.33、1.28(均 <2),表明Amphilysin-K20对以上3株菌均具有杀菌作用。在革兰氏阳性菌中,*B. subtilis* subsp. *Spizizenii*(MIC=5 μ g/mL, MBC=6 μ g/mL)、*S. aureus*(MIC=40 μ g/mL, MBC=48 μ g/mL)的MBC/MIC值均为1.20(≤ 2),同样符合杀菌型抗菌肽特性。

整体来看,Amphilysin-K20对测试菌的抗菌谱覆盖革兰氏阴性菌和部分革兰氏阳性菌,其中对*A. baumannii*(MIC=3 μ g/mL, MBC=4 μ g/mL)和*B. subtilis* subsp. *Spizizenii*(MIC=5 μ g/mL, MBC=6 μ g/mL)的抑制与杀灭效果最为显著。

2.2.2 时间杀灭曲线结果 为评估Amphilysin-K20的动态杀菌性能,基于其MIC值,测定了该肽在1×MIC、



A: 抗菌肽Amphilysin-K20的二级结构;深蓝色表示pLDDT>90,湖蓝色表示pLDDT>80,绿色表示pLDDT>70。B: 黄色,非极性疏水氨基酸;蓝色,极性带正电荷氨基酸;灰色,极性不带电荷中性酰胺类氨基酸。箭头长短表示平均疏水矩的大小(平均疏水矩是两亲性的量化值)。G: 甘氨酸;I: 异亮氨酸;L: 亮氨酸;R: 精氨酸;K: 赖氨酸;F: 苯丙氨酸;V: 缬氨酸;W: 色氨酸;A: 丙氨酸。

A: secondary structure of the antimicrobial peptide Amphilysin-K20. B: yellow represents non-polar hydrophobic amino acids; blue represents polar positively charged amino acids; gray represents polar uncharged neutral amide amino acids. The length of the arrow indicates the magnitude of the average hydrophobic moment (the average hydrophobic moment is a quantitative value of amphiphaticity). G: glycine; I: isoleucine; L: leucine; R: arginine; K: lysine; F: phenylalanine; V: valine; W: tryptophan; A: alanine.

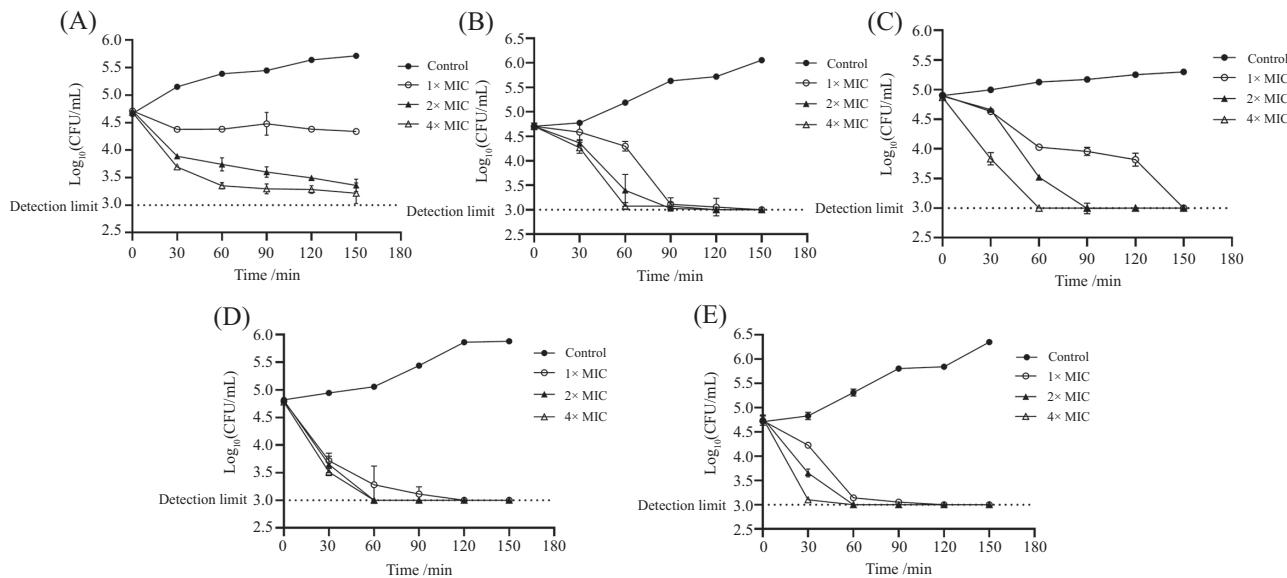
图1 抗菌肽Amphilysin-K20二级结构和轮投影预测图

Fig.1 Secondary structure prediction diagram and wheel projection of antimicrobial peptide Amphilysin-K20

表1 抗菌肽Amphilysin-K20对不同菌的MIC和MBC
Table 1 MIC and MBC of antimicrobial peptide Amphilysin-K20 on different bacteria

菌株 Strains	最小抑菌浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$		最小杀菌浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MBC / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
	MIC / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	2 \times MIC / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	
<i>E. coli</i>	6		8
<i>A. baumannii</i>	3		4
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>Spizizenii</i>	5		6
<i>S. aureus</i>	40		48
<i>P. aeruginosa</i>	25		32

n=3.



A: 金黄色葡萄球菌; B: 大肠杆菌; C: 鲍曼不动杆菌; D: 枯草芽孢杆菌; E: 铜绿假单胞菌。n=3。

A: *S. aureus*; B: *E. coli*; C: *A. baumannii*; D: *B. subtilis* subsp. *Spizizenii*; E: *P. aeruginosa*. n=3.

图2 抗菌肽Amphilysin-K20对不同菌的时间杀灭曲线

Fig.2 Time-kill curves of antimicrobial peptide Amphilysin-K20 against different bacteria

2 \times MIC及4 \times MIC浓度下作用于各测试菌株时, 菌落形成单位(CFU/mL)随时间(0~150 min)的对数变化。

如图2所示, Amphilysin-K20展现出快速杀菌活性。作用30 min时, 各浓度处理组均观察到活菌数显著下降。在随后的30~150 min内, 所有测试菌的活菌数持续呈对数级减少。最大杀菌效果出现在作用150 min时, 其中在4 \times MIC浓度下, *P. aeruginosa*的活菌数降幅超过3 \log_{10} (CFU/mL)。

浓度效应分析表明, Amphilysin-K20的杀菌速率和程度具有浓度依赖性。除*S. aureus*外, 其余测试菌株在2 \times MIC浓度下处理90 min后, 活菌数均降至检测下限(10^3 CFU/mL)。而4 \times MIC浓度处理组杀菌效果更为迅速, 60 min时活菌数即降至检测下限(10^3 CFU/mL)。值得注意的是, 在2 \times MIC浓度下处理90 min时, *S. aureus*

的活菌数仍可被检出($>10^3$ CFU/mL)。综合各菌株的时间杀灭曲线, Amphilysin-K20的杀菌效能呈现明确的浓度梯度效应: 4 \times MIC>2 \times MIC>1 \times MIC。

上述快速的杀菌动力学特征提示, Amphilysin-K20的作用机制可能涉及对细菌细胞结构的快速破坏(如细胞膜)或对关键胞内过程的快速抑制。

2.2.3 生物安全性评价 为全面评估Amphilysin-K20的生物安全性, 本研究采用CCK-8法检测其对人永生化角质形成细胞(HaCaT)的细胞毒性, 并通过兔红细胞溶血实验评估其潜在的血液相容性。细胞毒性结果(图3A)显示, Amphilysin-K20对HaCaT细胞活力的影响呈现明显的浓度依赖性。在较低浓度范围(0~16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)内, 细胞活力保持在较高水平: 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理时, 细胞活力仍大于95%, 与对照组相比

无统计学差异;当浓度达到16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞活力虽保持在90%以上,但与对照组相比已出现统计学显著差异($P<0.05$)。当浓度升至32~64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞活力显著下降至53%~67%,与对照组差异极显著($P<0.0001$)。当浓度高于64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞活力急剧下降至小于14%。综上所述,Amphilysin-K20浓度 $\leq 16 \mu\text{g}/\text{mL}$ 对HaCaT细胞表现出良好的体外相容性,细胞活力未受显著抑制。

溶血实验结果(图3B)旨在评估该肽的血液相容性潜力。参考标准[40],溶血率 $<5\%$ 通常被视为具有良好的血液相容性。以1% Triton-X-100作为100%溶血阳性对照,测定Amphilysin-K20对兔红细胞的溶血作用。结果表明,溶血率随肽浓度的升高而增加。关键浓度点的溶血率如下:在达细胞毒性安全浓度上限(16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)时,溶血率仅为1.39%;在较高测试浓度(128 $\mu\text{g}/\text{mL}$)时,溶血率为6.11%(略高于安全阈值5%);在256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,溶血率上升至14.25%。

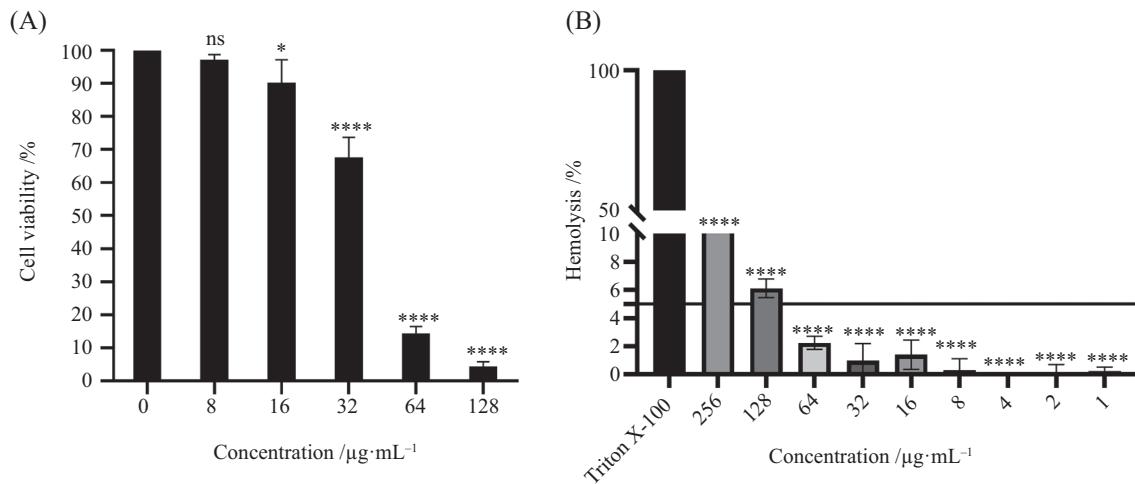
整合细胞毒性与溶血数据:在Amphilysin-K20的有效抗菌浓度范围($\leq 48 \mu\text{g}/\text{mL}$,基于MIC值确定)内,其溶血率始终低于4.00%。特别值得注意的是,在其对HaCaT细胞的安全浓度上限(16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)下,溶血率也极低(1.39%)。这些体外实验结果共同表明,Amphilysin-K20在有效抗菌浓度下对HaCaT细胞和红细胞均展现出良好的生物相容性,为其进一步开

发应用提供了重要的体外安全性依据。

2.3 Amphilysin-K20抗菌机制研究

2.3.1 抗菌肽Amphilysin-K20处理测试菌的扫描及透射电镜表征 扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)观察结果(图4)清晰展示了Amphilysin-K20对*E. coli*形态的影响。对照组菌体(图4A~图4C)呈典型杆状,表面光滑,细胞壁、膜结构完整,细胞排列规则有序。经Amphilysin-K20($2\times \text{MIC}$)处理后的菌体(图4D~图4F)则发生了显著的形态学改变:细胞壁明显皱缩、局部破裂或塌陷;部分菌体表面可见纤维状物质粘连(可能为外泄内容物或受损的膜/壁成分);部分细胞内容物外泄。这些特性提示细胞膜完整性遭到肽处理的严重破坏,膜通透性显著增加。

透射电镜(transmission electron microscope, TEM)观察结果(图5)进一步揭示了抗菌肽作用下的亚细胞结构变化。对照组(图5A和图5B)清晰地呈现了革兰氏阴性菌双层膜结构(外膜与内膜连续、完整),细胞质电子密度均匀。与之形成鲜明对比的是,经Amphilysin-K20处理的菌体(图5C和图5D)表现出严重的膜结构损伤:细胞膜模糊不清、局部溶解或断裂;同时,可观察到菌体表面空泡形成及明显的膜-壁分离现象(周质空间异常增宽);此外,还观察到细胞质电子密度的显著降低,并伴有大量内容物的外泄。



A: Amphilysin-K20对HaCat细胞的细胞毒性; B: Amphilysin-K20对兔血红细胞的溶血率。ns表示差异不显著, * $P<0.05$, **** $P<0.0001$, 与对照组相比。 $n=3$ 。

A: cytotoxicity of Amphilysin-K20 on HaCat cells; B: hemolysis rate of Amphilysin-K20 on rabbit red blood cells. ns indicates no significant difference, * $P<0.05$, **** $P<0.0001$ compared with the control group. $n=3$.

图3 Amphilysin-K20的生物安全性结果

Fig.3 Biosafety results of Amphilysin-K20

电镜结果综合分析表明, Amphilysin-K20通过快速破坏*E. coli*的细胞膜完整性(可能同时损伤细胞壁结构)发挥杀菌作用。这一观察结果与其设计理念及预测的两亲性 α -螺旋结构高度吻合:该结构可使其疏水区插入细菌细胞膜的磷脂双分子层, 扰乱膜的有序结构, 增加膜通透性, 最终导致膜破裂、细胞壁支撑力减弱及胞内物质泄漏。

尤为重要的是, 本实验观察到的显著膜损伤效应发生在Amphilysin-K20浓度为 $2\times$ MIC($12\ \mu\text{g}/\text{mL}$)时。结合前期数据: Amphilysin-K20对*E. coli*的MIC为 $6\ \mu\text{g}/\text{mL}$, 对HaCat细胞的毒性安全浓度阈值为 $\leq 16\ \mu\text{g}/\text{mL}$ (此时细胞活力 $>90\%$)。在 $2\times$ MIC($12\ \mu\text{g}/\text{mL}$)浓度下, 溶血率远低于其安全浓度上限值($16\ \mu\text{g}/\text{mL}$)下的 1.39% (图3B), 更远低于 5% 的安全阈值。

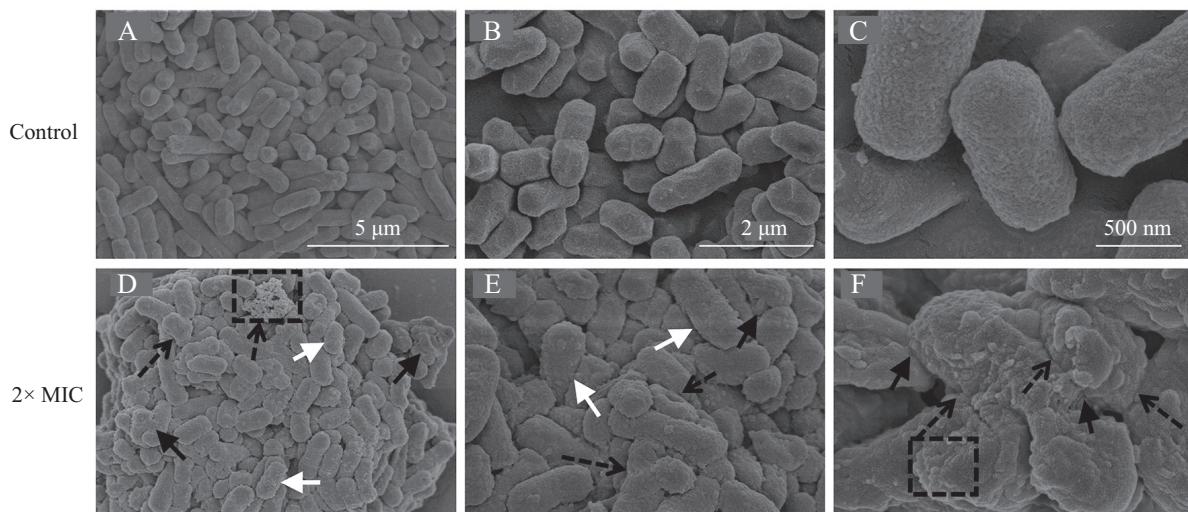
因此, 在电镜下可清晰观察到细菌发生显著膜损伤的抗菌肽作用浓度 $12\ \mu\text{g}/\text{mL}$, 该浓度不仅远低于对哺乳动物细胞(HaCaT)的毒性阈值($\leq 16\ \mu\text{g}/\text{mL}$), 而且其溶血率也极低(远低于 1.39%)。这一结果从形态学层面为Amphilysin-K20卓越的选择性抗菌活性(即对细菌的高效杀伤作用显著强于对哺乳动物细胞的毒性)提供了直接证据。

2.3.2 Amphilysin-K20与POPG膜最小距离及接触数量分析

细菌细胞膜与宿主细胞膜的关键差异在

于前者富含阴离子磷脂, 如磷脂酰甘油(phosphatidylglycerol, PG), 这是抗菌肽实现选择性靶向的分子基础。抗菌肽通过与PG等阴离子磷脂的特异性相互作用破坏膜完整性, 而宿主细胞膜以中性磷脂为主, 因此这种靶向结合是其选择性杀伤细菌的核心机制。为精准模拟细菌膜的生理微环境, 本实验采用POPG构建模拟体系。POPG作为细菌细胞膜中广泛存在的标准化PG分子, 具有明确的脂肪酸链组成(棕榈酰链C16:0、油酰链C18:1)^[41], 可有效还原抗菌肽与细菌膜互作的核心界面(磷脂头部磷酸基团与肽残基的极性作用区、脂双层疏水核心与肽疏水区域的作用区)^[42], 为解析其作用机制提供可靠模型。

为了研究肽与膜的相互作用, 我们首先从肽-膜体系轨迹中提取Amphilysin-K20与POPG膜的最小距离及接触数量变化数据, 这两项指标可直接反映二者的相互作用情况。由图6A可见, 最小距离从初始 $0.40\ \text{nm}$ 逐渐降至 $0.15\ \text{nm}$, 表明Amphilysin-K20在模拟过程中快速靠近POPG膜, 最终与膜表面紧密接触或发生部分插入。图6B显示的接触数量变化可分为3个阶段: 初始阶段($0\sim 20\ \text{ns}$), 接触数量从0迅速增至 250 以上, 提示抗菌肽通过N-端第1位甘氨酸(G1)(侧链仅含氢原子、无空间位阻, 可通过构象

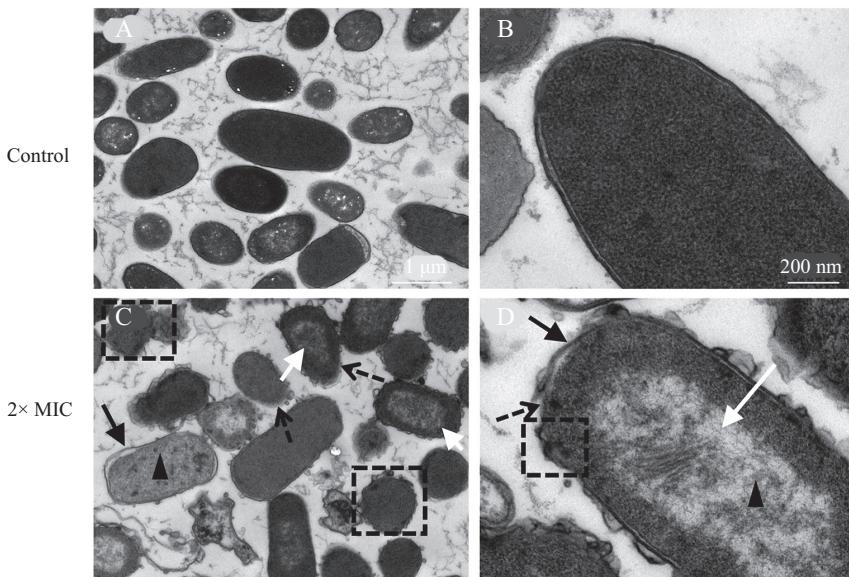


A~F: 抗菌肽Amphilysin-K20处理前、后的扫描电镜图; 白色箭头指示菌体皱缩; 黑色虚线箭头指示菌体破裂; 黑色虚线框指示内容物泄露; 黑色箭头指示菌体粘连。

A-F: images of bacteria before and after treatment with the antimicrobial peptide Amphilysin-K20, respectively. White arrows indicate bacterial cell shrinkage; black dashed arrows indicate bacterial cell rupture; black dashed boxes indicate cytoplasmic content leakage; black arrows indicate bacterial cell aggregation.

图4 扫描电子显微镜观察Amphilysin-K20处理的*E. coli*

Fig.4 SEM (scanning electron microscopy) observation of *E. coli* treated with Amphilysin-K20



A~D: 抗菌肽Amphilysin-K20处理前、后的透射电镜图;白色箭头指示菌体空泡化;黑色虚线箭头指示细胞膜溶解;黑色虚线框指示内容物泄漏;黑色箭头指示质壁分离;黑色三角形指示细胞质电子云密度降低。

A-D: TEM (transmission electron microscopy) images of bacteria before and after treatment with the antimicrobial peptide Amphilysin-K20, respectively. White arrows indicate bacterial vacuolization; black dashed arrows indicate bacterial cell membrane dissolution; black dashed boxes indicate cytoplasmic content leakage; black arrows indicate plasmolysis; black triangles indicate decreased electron density of the cytoplasm.

图5 透射电子显微镜观察Amphilysin-K20处理的大肠杆菌

Fig.5 TEM (transmission electron microscopy) observation of *E. coli* treated with Amphilysin-K20

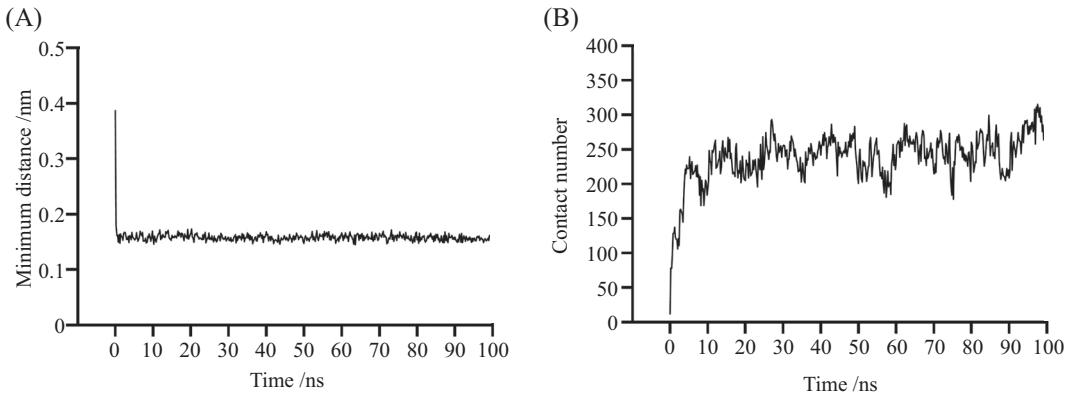
自适应快速调整肽链方向以靠近膜表面)^[43-44], 协同Arg4、Lys5、Lys12等阳离子残基与POPG膜磷酸基团(阴离子)的静电作用, 快速吸附至膜表面, 形成大量极性相互作用; 中期阶段(20~60 ns), 接触数量维持在250~300的峰值范围, 反映肽通过Leu3、Ile13、Leu16等疏水残基暴露并插入膜脂双层, 同时伴随 α -螺旋构象微调, 实现与膜的深入结合; 后期阶段(60~100 ns), 接触数量稳定在300左右(± 50 的波动或由热运动或瞬时构象变化引起), 表明体系达到动态平衡, 此时肽的阳离子残基(Arg、Lys)与膜磷酸基团形成稳定静电作用, Leu、Ile等疏水残基与膜烃链形成疏水网络, 两类作用协同, 共同维持结合状态, 为后续膜结构扰动提供了结构基础。

上述结果表明, Amphilysin-K20与POPG膜的相互作用呈现快速吸附、动态调整、稳定维持的特征过程。这种“快速结合-稳定作用”的分子动力学特征, 与前期快速杀菌效应(图2)形成呼应, 提示抗菌肽通过快速识别并结合细菌膜阴离子磷脂(如POPG), 可能是其高效杀菌的重要结构基础, 也为其选择性靶向细菌的机制提供了动态证据。

2.3.3 Amphilysin-K20与POPG膜相互作用分析——氢

键形成情况 为解析Amphilysin-K20与POPG膜的动态结合及构效关系, 通过分子动力学模拟对肽-膜氢键变化(图7)进行研究可发现: 0~20 ns内, 二者之间氢键数量快速上升, 表明肽通过Arg4(胍基)、Lys5(氨基)、Lys8(氨基)等阳离子极性残基与磷脂头部磷酸基团形成极性作用(静电作用或氢键), 迅速锚定膜表面, 此为初始吸附阶段; 20~60 ns, 氢键数量稳定在15~20个, 提示肽进入构象微调阶段, 暴露疏水残基嵌入膜疏水核心, 为杀菌作用奠定基础; 60~100 ns, 氢键维持约20个并小幅波动, 显示相互作用进入稳定期——疏水残基与磷脂烃链形成稳定疏水作用, 亲水残基通过氢键、静电作用与膜表面结合, 共同维持复合物稳定, 推测肽通过嵌入或部分插入膜干扰其稳定性以杀菌。同时, Amphilysin-K20内部氢键从初始约15个降至后期9~12个, 证实肽在互作中发生结构适应性调整, 或与增强其与膜的相互作用有关。模拟表明, 该肽通过快速吸附于膜表面、进行动态构象调整, 最终形成稳定结合的三阶段机制与POPG膜相互作用, 从而为其抗菌活性提供了分子层面的结构基础。

2.3.4 Amphilysin-K20与POPG膜整体的溶剂可及表

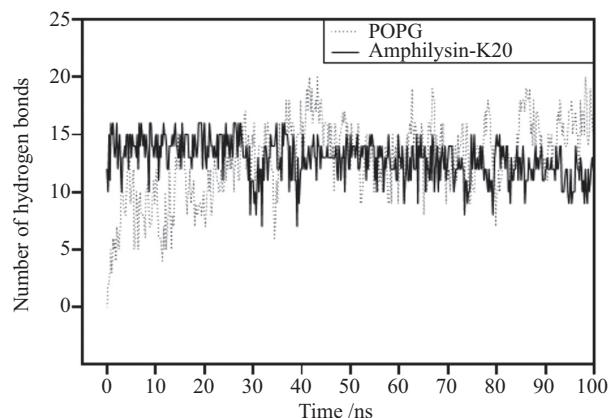


A: Amphilysin-K20与POPG膜的最小距离; B: Amphilysin-K20与POPG膜接触数量。

A: the minimum distance between Amphilysin-K20 and the POPG membrane; B: the number of contacts between Amphilysin-K20 and the POPG membrane.

图6 Amphilysin-K20与POPG膜最小距离及接触数量分析

Fig.6 Analysis of the minimum distance and contact number between Amphilysin-K20 and POPG membranes



黑色虚线: 抗菌肽与POPG膜形成的氢键数目变化; 黑色实线: 抗菌肽分子内形成的氢键数目变化。

Black dashed line: changes in the number of hydrogen bonds formed between the antimicrobial peptide and the POPG membrane; black solid line: changes in the number of intramolecular hydrogen bonds formed within the antimicrobial peptide.

图7 形成氢键数量变化

Fig.7 Changes in the number of hydrogen bonds formed

面积和接触表面积分析 为揭示 Amphilysin-K20 与 POPG 膜相互作用的界面特征, 通过分析肽-膜体系轨迹中的溶剂可及表面积 (solvent-accessible surface area, SASA) 及接触表面积 (contact surface area, CSA) 进行研究, 结果如图 8 所示。

图 8A 显示, 在 0~100 ns 的模拟中, Amphilysin-K20 的 SASA 整体稳定在 28~30 nm², 仅呈小幅波动: 60~80 ns 短暂升至近 30 nm² (可能与局部构象调整增加表面暴露有关), 80~100 ns 稳定在 26 nm² 左右, 此波动与图 7 中 60 ns 后分子内氢键稳定在 9~12 个一致, 证实肽通过构象调整维持膜结合稳定性, 而非整体结构失稳, 进一步支撑其结构维持一定稳定性的结

论。

在图 8B 中, POPG 膜的 SASA 变化趋势与肽相似: 模拟初期从 680 nm² 快速降至 580 nm² 左右 (推测因与肽接触所致), 后续稳定在 560~600 nm² 区间小幅波动, 提示膜与溶剂的接触状态稳定, 为肽的吸附和部分嵌入提供了稳定微环境。与图 6B 中 20 ns 后接触数量维持 250~300 的特征呼应, 说明膜-肽结合进入动态平衡, 二者相互作用强度不再显著变化, 进一步印证“稳定微环境”的合理性。

图 8C 的体系整体 SASA 变化与 POPG 膜相似 (因包含肽的 SASA 而略高): 模拟初期从 700 nm² 骤降至 600 nm² 左右, 推测因肽与膜接触引发——可能是肽

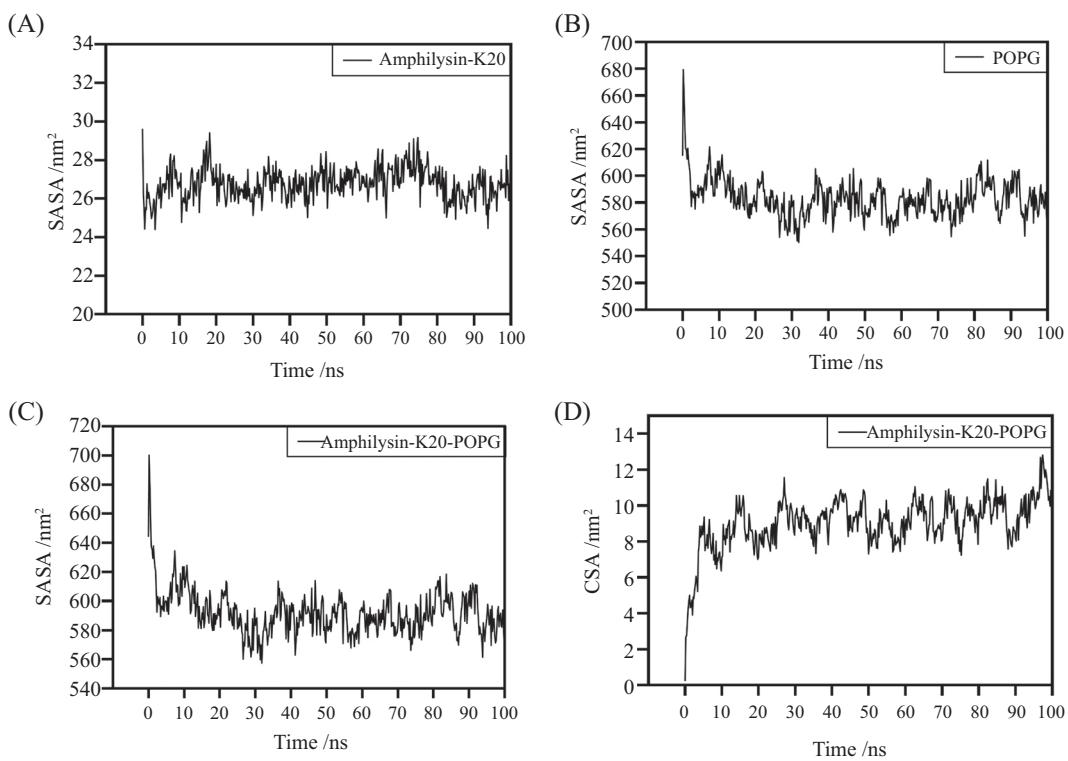
使膜结构更紧密或局部扰动,减少了膜与溶剂的接触面积,反映了二者相互作用紧密。结合图8D中同期CSA快速上升的趋势,可明确体系SASA下降与肽-膜接触面积增加直接相关,排除膜自身结构收缩的干扰。

图8D的CSA结果显示:0~20 ns从0快速升至9~11 nm²,表明肽通过静电作用迅速吸附于膜表面;20~60 ns或持续增加或小幅波动,反映肽进一步嵌入膜或构象调整(如螺旋伸展、疏水区域插入脂双层);60~100 ns稳定在12~14 nm²附近,体系达动态平衡。此阶段CSA稳定在12~14 nm²,与图8A肽SASA(26~28 nm²)、图8B膜SASA(560~600 nm²)的稳定区间完全同步,三者均仅在狭窄范围内小幅波动,共同证明肽膜互作进入动态平衡状态。

综上,Amphiphysin-K20与POPG膜的相互作用呈现快速吸附、构象调整、稳定结合的动态过程:初期CSA快速上升与膜SASA显著下降共同印证了快

速吸附;肽SASA的波动反映构象调整以适应膜结合;最终高且稳定的CSA,以及膜与肽的SASA维持稳定,表明二者形成紧密且稳定的结合状态。这种特征与膜SASA初期显著下降及体系整体SASA减少的趋势一致,提示其通过紧密结合干扰膜结构,为破坏膜完整性、发挥抗菌功能提供了结构支撑。

2.3.5 Amphiphysin-K20与POPG膜互作的轨迹分析
为了更直观揭示Amphiphysin-K20与POPG膜的动态互作过程,我们通过分子可视化工具VMD提取二者互作轨迹,并结合前文量化分析数据,共同呈现其“快速吸附、构象调整、稳定结合”的特征(图9):初始阶段(0~20 ns)内,轨迹呈现更细致的动态变化:早期(0~0.6 ns)——0 ns(图9A)与0.2 ns(图9B)时抗菌肽靠近膜但无显著作用;0.4 ns(图9C)与0.6 ns(图9D)时,肽主要通过静电作用快速吸附于膜表面,初始氢键开始形成,膜表面出现轻微扰动——这正是0~20 ns初始阶段中“快速吸附”的启动特征,与前文“接触数

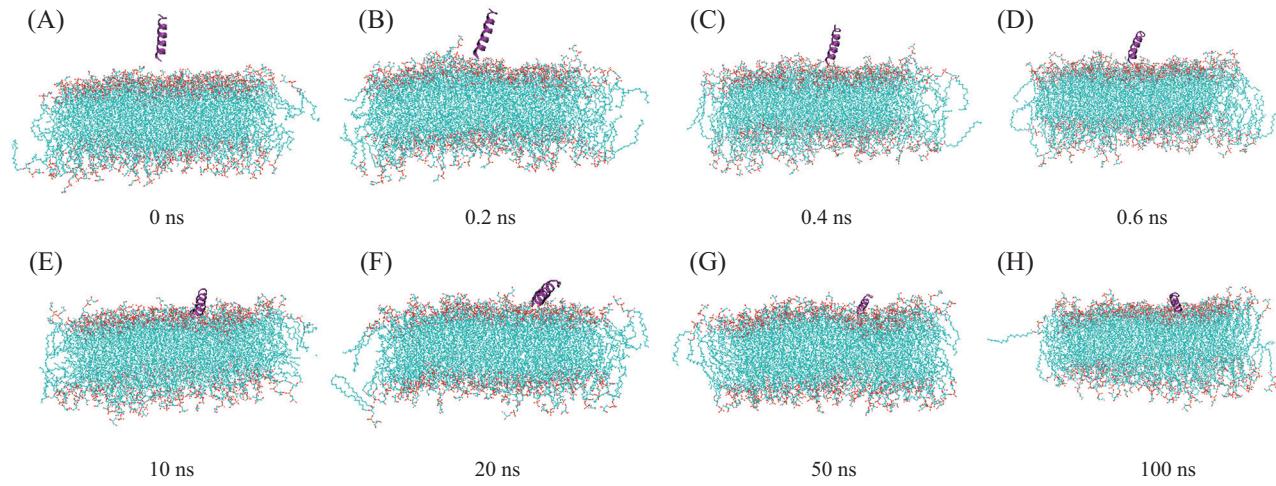


A: Amphiphysin-K20溶剂可及表面积变化; B: POPG膜溶剂可及表面积变化; C: Amphiphysin-K20与POPG膜溶剂可及表面积变化; D: Amphiphysin-K20与POPG膜体系接触表面积变化。

A: change in solvent-accessible surface area of Amphiphysin-K20; B: change in solvent-accessible surface area of POPG membrane; C: change in solvent-accessible surface area between Amphiphysin-K20 and POPG membrane; D: change in contact surface area of Amphiphysin-K20 and POPG membrane system.

图8 Amphiphysin-K20与POPG膜整体的溶剂可及表面积和接触表面积分析

Fig.8 Analysis of the solvent-accessible surface area and contact surface area between Amphiphysin-K20 and the overall POPG membrane



A: 0 ns; B: 0.2 ns; C: 0.4 ns; D: 0.6 ns; E: 10 ns; F: 20 ns; G: 50 ns; H: 100 ns.

图9 Amphilysin-K20与POPG膜相互作用的轨迹图

Fig.9 Trajectory diagram of the interaction between Amphilysin-K20 and POPG membranes

量骤增、CSA快速上升”的早期数据直接对应。其中,肽N-端G1的侧链仅含氢原子,无空间位阻,可快速调整肽链方向以靠近膜表面,符合文献报道的“甘氨酸通过构象自适应增强膜靶向效率”机制^[43-44],是0.4 ns启动快速吸附(图9C和图9D)的关键结构基础和分子机制。

初始阶段中后期(10~20 ns),静电作用减弱,氢键与疏水作用逐渐增强:10 ns(图9E)时肽持续吸附,氢键网络稳定形成,接触数量超250,多肽通过 α -螺旋构象调整使疏水区域更贴近膜内,脂质轻微重排,膜扰动增强;20 ns(图9F)时吸附趋于稳定,CSA达9~11 nm²,氢键与疏水作用协同维持结合,膜扰动扩大但未形成孔道——此过程属于0~20 ns初始阶段的收尾,与前文“接触数量近峰值”的初始阶段特征完全吻合。肽中的精氨酸(Arg)和赖氨酸(Lys)等阳离子残基,是与POPG膜磷酸基团初始静电吸附的核心位点,确保肽优先靶向细菌膜(富含阴离子磷脂)而非宿主膜(以中性磷脂为主),为“靶向吸附”提供了实验依据。

20 ns后,互作进入构象调整阶段(20~60 ns),至50 ns(图9G)时,抗菌肽对膜的作用进一步增强:部分插入膜内,氢键向膜内延伸(如疏水残基与脂质尾部的弱相互作用),疏水作用主导驱动脂质重排,膜流动性增加——这一状态对应前文20~60 ns“接触数量波动、SASA稳定”的构象调整特征,为后续膜结构破坏奠定基础。结合图8D中同期CSA波动趋势可知,“构象调整”的本质是肽通过 α -螺旋局部伸展(如疏

水区域暴露增加),进一步扩大与膜的接触面积,使CSA从10~11 nm²逐步升至12~13 nm²,此即“波动”现象的物理意义。

60 ns后进入稳定阶段(60~100 ns),100 ns(图9H)时,肽与膜稳定结合(可能部分嵌入或诱导孔道),CSA维持在12~14 nm²,氢键与疏水作用共同维持稳定状态,膜扰动趋于恒定——与前文60~100 ns“体系SASA平稳”的最终平衡特征吻合,提示此时肽与膜的互作已进入稳定状态。此阶段膜扰动范围不再扩大,且CSA、SASA等量化指标均无显著波动,证明肽-膜互作已达动态平衡,肽与膜维持稳定的相互作用的结论并非推测,而是基于多指标同步稳定的实验证据。

综上,轨迹分析通过微观时间点的动态观察,清晰展现了Amphilysin-K20与POPG膜从快速吸附到稳定结合的全过程,各阶段直观特征与前文量化数据(接触数量、CSA、SASA等)完全呼应,进一步证实二者通过“静电主导吸附、氢键与疏水协同调整、多作用力维持稳定”的递进机制形成紧密互作,为其靶向破坏膜完整性、发挥抗菌功能提供了直观的动态证据。

3 讨论

随着细菌耐药性问题的加剧,新型抗感染药物的研发已成为全球健康领域的迫切需求。抗菌肽凭借独特作用机制及替代抗生素的潜力,成为该领域的研究焦点。本研究基于(XXYY)_n模板,创新采用

“骨架-两端”协同优化策略,成功设计出兼具高效膜靶向杀菌活性与良好生物相容性的抗菌肽Amphilysin-K20。该策略通过双重精准设计实现功能突破。第一,骨架创新实现活性与安全性的平衡。我们在传统XXYY重复单元中,创新性地引入了XYY单元,构建了“XXYY(高疏水)-XYY(中疏水)”交替骨架。这种设计将疏水残基占比精准调控至60%,既保障了抗菌肽对细菌膜发挥作用所需的插入活性,又通过避免疏水氨基酸的聚集显著降低了对宿主细胞的非特异性杀伤作用,从结构设计层面有效解决了抗菌肽高活性常伴随高毒性的核心难题。第二,两端修饰增强靶向效率与结构稳定。N-端采用单一甘氨酸(Gly)修饰,利用其无侧链特性增强肽链柔性,提升了对细菌膜的初始靶向与结合速率;C-端采用单一丙氨酸(Ala)修饰,作为 α -螺旋倾向残基,有效稳定了整体螺旋构象(AlphaFold2预测pLDDT>90的残基占比达85%)。正如结果部分所验证的,这一创新设计使Amphilysin-K20完美实现了膜靶向快速杀菌与良好生物相容性的统一:其对革兰阴性菌与革兰阳性菌均表现出显著的杀菌活性(MBC/MIC≤2,150 min内即可完成杀菌);同时在有效抗菌浓度下,对哺乳动物细胞的生物安全性良好,为后续研究奠定了坚实基础。

体外抗菌实验表明,Amphilysin-K20对革兰氏阳性菌(*B. subtilis* subsp. *Spizizenii*、*S. aureus*)和革兰氏阴性菌(*E. coli*、*A. baumannii*、*P. aeruginosa*)均具杀菌活性,MBC/MIC值均≤2,属杀菌型抗菌肽。其中对*A. baumannii*(MIC=3 μ g/mL,MBC=4 μ g/mL)和*B. subtilis* subsp. *Spizizenii*(MIC=5 μ g/mL,MBC=6 μ g/mL)效果最显著,对*S. aureus*(MIC=40 μ g/mL,MBC=48 μ g/mL)和*P. aeruginosa*(MIC=25 μ g/mL,MBC=32 μ g/mL)也展现出明确杀菌活性。*S. aureus*的MIC(40 μ g/mL)显著高于其他菌株,可能与多重防御机制及本研究的设计细节相关。首先,作为革兰氏阳性菌,其较厚的肽聚糖层可形成物理屏障,阻碍抗菌肽穿透^[45]。其次,细胞壁富含的磷壁酸等带负电荷成分,可能与Amphilysin-K20骨架中引入的赖氨酸等阳离子残基发生非特异性结合,形成“电荷屏障”——这与设计中“通过阳离子残基增强靶向性”的思路形成对比,提示针对革兰氏阳性菌的阳离子残基种类或密度需进一步优化;更深层的原因在于其主动分泌的蛋白酶降解机制:文献证实,*S. aureus*

可分泌金属蛋白酶(Aureolysin)等,通过切割抗菌肽特定肽键(如LL-37的Arg19-Ile20等位点)使其失活^[46]。Amphilysin-K20序列中富含Lys、Arg等碱性氨基酸(如KFKKVFKKIKR段,为骨架中增强正电荷的关键区域),可能一定程度上被这类蛋白酶识别并切割,导致结构被破坏、活性被削弱,最终需要更高浓度才能发挥作用。

时间杀灭曲线显示,除金黄色葡萄球菌需在4×MIC浓度下处理150 min活菌数降至检测下限(10^3 CFU/mL)外,其余测试菌株在2×MIC浓度下处理90 min后,活菌数即可降至检测下限,整体体现出快速杀菌特性。相较于经典抗菌肽LL-37(6 h内完成大量杀菌^[47]),Amphilysin-K20杀菌动力学更优,且呈时间和浓度双重依赖性,4×MIC浓度下60 min内多数菌株活菌数即可降至检测限以下,能快速减少细菌存活以降低耐药突变风险。与序列相似的 α -螺旋抗菌肽Magainin II相比^[48](对*A. baumannii*的MIC为2 μ mol/L,约4.93 μ g/mL,大于Amphilysin-K20的MIC 3 μ g/mL),Amphilysin-K20展现出更强的抗菌活性。即使二者均由天然氨基酸组成,但其首尾序列设计逻辑存在显著差异:经典 α -螺旋抗菌肽(如Magainin II、LL-37)的首尾序列为天然蛋白来源的随机排列,而本肽为“首尾优化设计”——Magainin II的N-端为GIG(Gly-Ile-Gly),虽首个残基为Gly(与本肽N-端一致),但后续衔接的Ile(疏水大侧链)破坏了Gly的柔性调节作用,经实验测定^[45],其在水环境中呈无规卷曲结构,需结合细菌膜后 α -螺旋含量才升至33.3%~50.8%;LL-37的N-端为LLG(Leu-Leu-Gly),前2个Leu(疏水大侧链)易被氨肽酶识别切割^[46],且文献[49]实验证实,含大疏水侧链的未修饰N-端会增加抗菌肽对氨肽酶的敏感性。相比之下,Amphilysin-K20的N-端仅保留单一甘氨酸(无侧链),精准规避了“大侧链干扰柔性”的问题。经AlphaFold2预测,其N-端可维持较高柔性;这种结构特性有利于其在抗菌过程中快速调整构象,靠近细菌膜表面。C-端单一丙氨酸(仅含甲基侧链),作为一种具有高 α -螺旋倾向性的残基,有助于稳定整体构象。这一点得到了AlphaFold2预测结果的支持,该预测显示肽段形成了高置信度的连续 α -螺旋结构(pLDDT>90的残基占比达85%)。这种设计结合高正电荷(+8>Magainin II的+3)、有序亲疏水界面,从结构预测视角为活性更优提供了支撑,且与经典肽的首尾随机排列、结构稳定性/抗降解

性不足的实验趋势一致,进一步验证了“电荷-疏水性协同+优化”设计策略的有效性。

生物安全性是抗菌肽实际应用的关键^[50]。在本研究中,Amphilysin-K20在0~16 μg/mL时对HaCaT毒性极低(细胞活力>90%),16 μg/mL时溶血率仅1.39%,128 μg/mL时溶血率为6.11%,在有效抗菌浓度(≤48 μg/mL)范围内溶血率始终<4%,且安全浓度(16 μg/mL)为*E. coli* MIC(6 μg/mL)的近3倍。这种“高活性-低毒性”平衡的机制,可通过设计中的“骨架-两端协同优化”逻辑解释:一方面,骨架构建的有序亲疏水界面与高正电荷协同,使肽优先通过静电吸引结合细菌膜,并通过疏水插入的方式破坏膜结构(扫描/透射电镜观察到*E. coli*菌体破裂,分子动力学模拟证实的“吸附、插入、扰动”三阶段作用);另一方面,N-端甘氨酸的柔性与C-端丙氨酸的螺旋稳定作用共同维持了两亲性构象,而哺乳动物红细胞膜因富含胆固醇可增强膜稳定性,抑制肽的深度插入^[51]——这种设计赋予的结构特性与哺乳动物细胞膜自身的防御机制协同,正是Amphilysin-K20低溶血特性的核心原因。

本研究的“骨架-两端”协同设计,是在传统(XXYY)_n模板基础上为平衡抗菌活性与生物安全性而提出的优化策略。传统单一骨架优化策略(如仅增加XXYY重复单元)常伴随较高的溶血毒性,例如WIRADHARMA等^[31]的研究显示,(LLRR)₄与(FFRR)₄在16 μg/mL浓度下溶血率分别高达>50%与约30%。相比之下,本研究采用的协同策略则展现出显著优势:Amphilysin-K20在同等浓度(16 μg/mL)下溶血率仅为1.39%,同时对大肠杆菌的MIC低至6 μg/mL,从而在分子层面较好地实现了抗菌活性与生物安全性的双向平衡,凸显了该策略在提升抗菌肽综合性能方面的有效性与实用性。

综上,本研究不仅获得了综合性能优异的抗菌肽Amphilysin-K20,更为抗菌肽的理性设计提供了一条具有潜在挖掘与应用价值的可行策略。展望未来,对基于此策略设计获得的抗菌肽进行深度优化将有助于进一步提高抗菌肽的各方面性能:例如,针对本研究揭示的对*S. aureus*活性不足的短板,可通过定点突变精细调整其局部的疏水性与电荷分布;或尝试引入非天然氨基酸/D-型氨基酸,以此有效抵抗细菌分泌蛋白酶的降解作用,提升抗菌肽在复杂感染环境中的稳定性。同时,探索Amphilysin-K20与

临床常用抗生素的协同效应,有望为应对多重耐药菌感染提供新的联合治疗方案。这些后续工作将共同推动该设计策略从成功的实验室研究向现实的临床应用转化。

参考文献 (References)

- [1] KATZ L, BALTZ R H. Natural product discovery: past, present, and future [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2016, 43(2/3): 155-76.
- [2] 谭凯文, 冯晓雯, 张冰芸, 等. 中国抗生素健康素养与抗生素滥用的研究进展[J]. 广州医科大学学报(TAN K W, FENG X W, ZHANG B Y, et al. Research progress on antibiotic health literacy and antibiotic abuse in China [J]. Academic Journal of Guangzhou Medical University), 2023, 51(2): 76-80.
- [3] 吕颖捷, 黄敏, 柴凤兰, 等. 畜禽养殖中抗生素的使用现状、问题及对策[J]. 中兽医学杂志(LÜ Y J, HUANG M, CHAI F L, et al. Current status, problems and countermeasures of antibiotic use in livestock and poultry breeding [J]. Chinese Journal of Animal Science), 2024(5): 43-5.
- [4] RAMATLA T, MOKGOKONG P, LEKOTA K, et al. Antimicrobial resistance profiles of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from broiler chickens [J]. *Food Microbiol*, 2024, 120: 104476.
- [5] GBD 2021 Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990-2021: a systematic analysis with forecasts to 2050 [J]. *Lancet*, 2024, 404(10459): 1199-226.
- [6] 2023 Antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis [R]. Geneva: World Health Organization, 2024.
- [7] HUAN Y, KONG Q, MOU H, et al. Antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 582779.
- [8] TUERKOVA A, KABELKA I, KRALOVA T, et al. Effect of helical kink in antimicrobial peptides on membrane pore formation [J]. *eLife*, 2020, 9: e47946.
- [9] GAO X, CHEN Y, CHEN Z, et al. Identification and antimicrobial activity evaluation of three peptides from laba garlic and the related mechanism [J]. *Food Funct*, 2019, 10(8): 4486-96.
- [10] PARK P, MATSUBARA D K, BARZOTTO D R, et al. Vesicle protrusion induced by antimicrobial peptides suggests common carpet mechanism for short antimicrobial peptides [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 9701.
- [11] LEGRAND B, LAURENCIN M, SARKIS J, et al. Structure and mechanism of action of a *de novo* antimicrobial detergent-like peptide [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1808(1): 106-16.
- [12] MIHAJLOVIC M, LAZARIDIS T. Antimicrobial peptides in toroidal and cylindrical pores [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1798(8): 1485-93.
- [13] JARVA M, LAY F T, PHAN T K, et al. X-ray structure of a carpet-like antimicrobial defensin-phospholipid membrane disruption complex [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1962.
- [14] CHEN E H, WANG C H, LIAO Y T, et al. Visualizing the membrane disruption action of antimicrobial peptides by cryo-electron tomography [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 5464.

- [15] LE C F, FANG C M, SEKARAN S D. Intracellular targeting mechanisms by antimicrobial peptides [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(4): e02340-16.
- [16] SNEIDERIS T, ERKAMP N A, AUSSERWOGER H, et al. Targeting nucleic acid phase transitions as a mechanism of action for antimicrobial peptides [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 7170.
- [17] D'ANDREA L D, ROMANELLI A. Temporins: multifunctional peptides from frog skin [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6): 5426.
- [18] GHAZAL A, CLARKE D, ABDEL-RAHMAN M A, et al. Venomous gland transcriptome and venom proteomic analysis of the scorpion *Androctonus amoreuxi* reveal new peptides with anti-SARS-CoV-2 activity [J]. *Peptides*, 2024, 173: 171139.
- [19] BRICE D C, TOTH Z, DIAMOND G. LL-37 disrupts the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus envelope and inhibits infection in oral epithelial cells [J]. *Antiviral Res*, 2018, 158: 25-33.
- [20] YU C H, TSAI M S, LIAO C H, et al. Ceftazidime-avibactam for the treatment of carbapenem-resistant klebsiella pneumoniae infection: a retrospective, single center study [J]. *Infect Drug Resist*, 2024, doi: 10.2147/IDR.S475679.
- [21] ABEBE A, BIRHANU A. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: molecular mechanisms underlying drug resistance development and novel strategies to combat [J]. *Infect Drug Resist*, 2023, doi: 10.2147/IDR.S428103.
- [22] MHLONGO J T, WADDAD A Y, ALBERICIO F, et al. Antimicrobial peptide synergies for fighting infectious diseases [J]. *Adv Sci*, 2023, 10(26): e2300472.
- [23] TAHERI-ARAGHI S. Synergistic action of antimicrobial peptides and antibiotics: current understanding and future directions [J]. *Front Microbiol*, 2024, 15: 1390765.
- [24] ZHONG C, ZHU Y, ZHU N, et al. Synthesis and anti-pseudomonal activity of new ss-Ala modified analogues of the antimicrobial peptide anoplin [J]. *Int J Med Microbiol*, 2020, 310(5): 151433.
- [25] ERAK M, BELLMANN-SICKERT K, ELS-HEINDL S, et al. Peptide chemistry toolbox-transforming natural peptides into peptide therapeutics [J]. *Bioorg Med Chem*, 2018, 26(10): 2759-65.
- [26] LUO X, CHEN H, SONG Y, et al. Advancements, challenges and future perspectives on peptide-based drugs: focus on antimicrobial peptides [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2023, doi: 10.1016/j.ejps.2022.106363.
- [27] COSTA F, TEIXEIRA C, GOMES P, et al. Clinical application of AMPs [M]. Singapore: Springer Singapore, 2019: 281-98.
- [28] MAHLAPUU M, HÄKANSSON J, RINGSTAD L, et al. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2016, doi: 10.3389/fcimb.2016.00194.
- [29] MERZOUG M, ZATER Z Y, MOSBAHI K, et al. Synthetic biology-based heterologous expression and purification of enterocin a: advancing antimicrobial peptide applications [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2025, 70(1): e70260.
- [30] GOLES M, DAZA A, CABAS-MORA G, et al. Peptide-based drug discovery through artificial intelligence: towards an autonomous design of therapeutic peptides [J]. *Brief Bioinform*, 2024, 25(4): bbae275.
- [31] WIRADHARMA N, KHOE U, HAUSER C A E, et al. Synthetic cationic amphiphilic α -helical peptides as antimicrobial agents [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(8): 2204-12.
- [32] JIA B, WANG Y, ZHANG Y, et al. High cell selectivity and bactericidal mechanism of symmetric peptides centered on d-Pro-Gly Pairs [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 1140.
- [33] ZASLOFF M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms [J]. *Nature*, 2002, 415(6870): 389-95.
- [34] 周宇, 李佳玉, 王乐, 等. 金黄色葡萄球菌小菌落突变体诱导筛选及特性研究[J]. 中国农业科技导报(ZHOU Y, LI J Y, WANG L, et al. Induction screening and characteristics of *Staphylococcus aureus* small colony variants [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*), 2023, 25(5): 147-57.
- [35] ZHANG X, JIANG A, YU H, et al. Human lysozyme synergistically enhances bactericidal dynamics and lowers the resistant mutant prevention concentration for metronidazole to helicobacter pylori by increasing cell permeability [J]. *Molecules*, 2016, 21(11): 1435.
- [36] WANG C, TIAN L L, LI S, et al. Rapid cytotoxicity of antimicrobial peptide tempoprin-1CEa in breast cancer cells through membrane destruction and intracellular calcium mechanism [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e60462.
- [37] CLARK S, JOWITT T A, HARRIS L K, et al. The lexicon of antimicrobial peptides: a complete set of arginine and tryptophan sequences [J]. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 605.
- [38] MA X, YANG N, MAO R, et al. Self-assembly antimicrobial peptide for treatment of multidrug-resistant bacterial infection [J]. *J Nanobiotechnology*, 2024, 22(1): 668.
- [39] MURTAS G, SACCHI S, TEDESCHI G, et al. Antimicrobial d-amino acid oxidase-derived peptides specify gut microbiota [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(7): 3607-20.
- [40] KHAN M U A, STOJANOVIC G M, REHMAN R A, et al. Graphene oxide-functionalized bacterial cellulose-gelatin hydrogel with curcumin release and kinetics: *in vitro* biological evaluation [J]. *ACS Omega*, 2023, 8(43): 40024-35.
- [41] WADEESIRISAK K, CASTANO S, VAYSSE L, et al. Interactions of REF1 and SRPP1 rubber particle proteins from Hevea brasiliensis with synthetic phospholipids: effect of charge and size of lipid headgroup [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023, 679: 205-14.
- [42] ZHAO L, CAO Z, BIAN Y, et al. Molecular dynamics simulations of human antimicrobial peptide LL-37 in model POPC and POPG lipid bilayers [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(4): 1186.
- [43] 韩晋辉, 翟培, 吕文平. 单点氨基酸替换对杂合肽KL-21生物活性的影响[J]. 中国畜牧兽医(HAN J H, ZHAI P, LÜ W P. Effect of single amino acid substitutionon bioactivity of heterozygous peptide KL-21 [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*), 2025, 52(5): 2400-8.
- [44] LOFFREDO M R, CASCIARO B, BELLAVITA R, et al. Strategic single-residue substitution in the antimicrobial peptide Esc(1-21) confers activity against *staphylococcus aureus*, including drug-resistant and biofilm phenotype [J]. *ACS Infectious Diseases*, 2024, 10(7): 2403-18.
- [45] MALANOVIC N, LOHNER K. Antimicrobial peptides targeting gram-positive bacteria [J]. *Pharmaceuticals*, 2016, 9(3): 59.
- [46] SIEPRAWSKA-LUPA M, MYDEL P, KRAWCZYK K, et al. Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(12): 4673-9.
- [47] SONG Y, ZHANG S, ZHAO N, et al. *Pseudomonas aeruginosa*

- two-component system CprRS regulates HigBA expression and bacterial cytotoxicity in response to LL-37 stress [J]. PLoS Pathog, 2024, 20(1): e1011946.
- [48] KIM M, KANG N, KO S, et al. Antibacterial and antibiofilm activity and mode of action of magainin 2 against drug-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(10): 3041.
- [49] HIRANO M, SAITO C, YOKOO H, et al. Development of antimicrobial stapled peptides based on magainin 2 sequence [J]. Molecules, 2021, 26(2): 444.
- [50] 孙明杰, 盛永杰, 郝木强, 等. 天蚕素抗菌肽在饲料应用中的安全性研究[J]. 中国饲料(SUN M J, SHENG Y J, HAO M Q, et al. Safety evaluation of cecropin antimicrobial peptides in feed applications [J]. China Feed), 2022(3): 43-6.
- [51] LI J, LU X, MA W, et al. Cholesterols work as a molecular regulator of the antimicrobial peptide-membrane interactions [J]. Front Mol Biosci, 2021, doi: 10.3389/fmolb.2021.638988.