

· 综 述 ·

抗酶解抗菌肽的研究进展

邵长轩, 王梦成, 王袁梦雪, 何诗琪, 朱永杰, 单安山*

东北农业大学 动物科学技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150030

邵长轩, 王梦成, 王袁梦雪, 何诗琪, 朱永杰, 单安山. 抗酶解抗菌肽的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(12): 4396-4407.

SHAO Changxuan, WANG Mengcheng, WANG Yuanmengxue, HE Shiqi, ZHU Yongjie, SHAN Anshan. Research progress in anti-enzymatic antimicrobial peptides[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(12): 4396-4407.

摘要: 抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)是机体先天免疫中的一类小分子多肽, 作为机体防御的第一道防线, 在自然界中广泛存在。AMPs 具有多种生物学活性且不易产生耐药性, 但天然AMPs 容易被体内的各种消化酶降解。在 AMPs 中引入非天然氨基酸、化学修饰、合理规避酶切位点进行氨基酸重排、肽的环化、纳米肽设计等提高 AMPs 蛋白酶稳定的方法不断出现。本文重点综述了提高 AMPs 蛋白酶稳定性的各种方法, 以期为此领域的研究提供参考。

关键词: 抗菌肽; 蛋白酶稳定性; 非天然氨基酸; 化学修饰; 残基排布; 环化; 纳米技术

Research progress in anti-enzymatic antimicrobial peptides

SHAO Changxuan, WANG Mengcheng, WANG Yuanmengxue, HE Shiqi, ZHU Yongjie, SHAN Anshan*

College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China

Abstract: Antimicrobial peptides (AMPs) are small molecular peptides widely existing in the innate immunity of organisms, serving as the first line of defense. Natural AMPs possess various biological activities and are difficult to develop drug resistance. However, they are easily broken down by digestive enzymes in the body. In recent years, increasing methods have been reported to enhance the stability of AMPs, including incorporation of unnatural amino acids, chemical

资助项目: 中国博士后科学基金(2022M720694); 黑龙江省自然科学基金优秀青年项目(YQ2022C015); 黑龙江省博士后资助项目(LBH-Z22007); 黑龙江省高校协同创新成果项目(LJGXCG2022-022)

This work was supported by the China Postdoctoral Science Foundation (2022M720694), the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (YQ2022C015), the Heilongjiang Postdoctoral Fund (LBH-Z22007), and the Heilongjiang Provincial Universities Collaborative Innovation Program (LJGXCG2022-022).

*Corresponding author. E-mail: asshan@neau.edu.cn

Received: 2024-01-26; Accepted: 2024-05-27; Published online: 2024-05-29

modifications, strategic avoidance of enzyme cleavage sites, cyclization, and nano peptide design. This review summarizes the methods for improving the stability of AMPs against protease degradation, aiming to provide references for further research in this field.

Keywords: antimicrobial peptide; protease stability; unnatural amino acids; chemical modification; arrangement of residues; cyclization; nanotechnology

从 1928 年世界上第一种抗生素被发现至今, 抗生素被广泛应用于医疗、食品、畜牧等领域。但抗生素耐药性的出现进一步加剧了对新型抗菌剂的需求, 而抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)因其不易产生耐药性、具有广谱抗菌活性及调节宿主免疫等功能成为最具前景的替抗手段之一^[1]。

AMPs 作为机体免疫的重要组成部分, 具有抗细菌、真菌、病毒、寄生虫、抗癌以及抗肿瘤等多种功能^[2-5]。大多数 AMPs 的主要抑菌机理为破坏细菌细胞膜的完整性, 这种不同于抗生素作用于特定靶点的作用机制使病原微生物不易对其产生耐药性。然而, AMPs 在研发过程中存在生产成本高、安全性低和稳定性差等问题。虽然研究人员通过重组表达 AMPs^[6]、截短序列明确构效关系^[7]以及杂合降低毒性^[8]等方法在一定程度上促进了 AMPs 的发展, 但蛋白酶稳定性差仍是限制 AMPs 生产应用的关键问题。AMPs 序列中的碱性氨基酸和疏水性氨基酸是机体中各种消化酶如胰蛋白酶、糜蛋白酶、胃蛋白酶以及各种病原体分泌酶如蛋白酶 K 等^[9-10]作用的底物, 这些蛋白酶能够识别特定的酶切位点, 破坏 AMPs 的结构从而影响其功能活性^[11]。因此, 开发提高 AMPs 蛋白酶稳定性的方法对于其体内应用尤为重要。

1 引入非天然氨基酸

1.1 D-型氨基酸

由于天然氨基酸通常呈现 L-型构象, 使其易被蛋白酶识别。在肽序列中引入 D-型氨基酸

替换 L-型氨基酸可以有效解决 AMPs 易被蛋白酶降解的难题。由于 D-型氨基酸具有较好的商业可用性和低合成成本, D-型氨基酸取代是目前应用较为广泛的提高 AMPs 蛋白酶稳定性的策略。

Carmona 等^[12]采用 L-型氨基酸合成 AMPs Pin2 (FWGALAKGALKLIPSLFSSFSKGD), 发现其与牛胰蛋白酶作用 4 h 后不会被降解, 而采用 L-型氨基酸合成的 AMPs 则会被胰蛋白酶分解为 2 个肽段。此外, 序列中引入 D-氨基酸还可以在在一定程度上降低毒性。Papo 等^[13]将赖氨酸(Lys)和亮氨酸(Leu)组成的肽段进行特定位点氨基酸替换, 使序列中不出现 3 个连续排列的 L-氨基酸, 结果显示 L-型氨基酸的肽具有较高的溶血活性且易被酶解, 而使用 D-型氨基酸替换后不仅具有较低的溶血活性, 而且抗酶解能力和血清稳定性均有所增强。因此, 引入 D-型氨基酸是一种提高 AMPs 抗酶解能力同时降低毒性的十分有前景的方法。

1.2 β -氨基酸

另一种提高 AMPs 蛋白酶稳定性的有效方法是在肽链中引入 β -氨基酸。 β -氨基酸的特征是在 α -肽的主链上引入 1 个额外的碳原子。 α -氨基酸是指氨基连在羧酸的 α -位, β -氨基酸则是指氨基连在羧酸的 β -位。根据氨基酸侧链(R 基团)连接位置的不同, 可细分为 β^2 -氨基酸和 β^3 -氨基酸。与 α -氨基酸相比, 由于缺失蛋白酶识别支架, β -氨基酸对蛋白酶降解不敏感。

Dewangan 等^[14]首次采用将 β -氨基酸与 D-型氨基酸相结合的策略, 设计得到的衍生肽

UNA-12 在 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的胰蛋白酶和蛋白酶 K 孵育 24 h 后保持完整, 而由 L-型氨基酸组成的 A-12 则在 1 h 内被水解。 β -氨基酸与 D-型氨基酸相结合不仅提高了蛋白酶稳定性而且对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)表现出了较高的抑菌活性。此外, De Lucio 等^[15]发现天然线性 13 肽 TRL35 能够迅速被蛋白酶 K 分解, 通过将其中部分氨基酸替换为 β^3 -氨基酸后, 其半衰期相对提高了 6–14 倍。

1.3 其他非天然氨基酸

除了 D-型氨基酸和 β -氨基酸外, 在肽段中引入其他非天然氨基酸, 如 L-2,4-二氨基丁酸(L-2,4-diaminobutanoic acid, Dab)、L-2-氨基-3-胍基丙酸(L-2-amino-3-guanidino-propionic acid, Agp)、 β -萘基丙氨酸(β -naphthylalanine, Nal)、 α -氨基异丁酸(α -aminoisobutyric acid, Aib)等, 使得蛋白酶不易识别作用位点从而赋予 AMPs 更高的蛋白酶稳定性。

本课题组将蛙源衍生肽 W8 (AARIILRWFR) 中的精氨酸(arginine, Arg)替换为 Dab, Dab 修饰的衍生肽 U1 能够有效抵抗 10 mg/mL 的胰蛋白酶降解; 在 Dab 的基础上引入色氨酸(tryptophan, Trp)设计得到抗酶解优化单元(DabW)_n, 当 $n=3$ 时, 衍生肽 U1-2WD 能够有效抵抗模拟肠液、模拟胃液以及高浓度的糜蛋白酶溶液的水解, 具有良好的蛋白酶稳定性^[16]。此外, Knappe 等^[17]将 AMPs Sub3 (RRWRIVVIRVRR-CONH₂)中的 Arg 替换为 Agp, 替换后的衍生肽 Sub3-Agp 稳定性显著提高, Sub3-Agp 在血清蛋白酶中孵育 8 h 降解率低于 20%, 未经过 Agp 替换的 Sub3 则完全被水解, 而在 Sub3 的 N 端和 C 端分别引入 D-Ala 和 D-His 延长序列对血清蛋白酶稳定性没有任何影响。本课题组在 AMPs D1 (AArIIIrWrFR, 其中 r 为 D-Arg)的尾端锚定 1 个 Nal 后, 在不增加毒性的前提下有效提高了 D1

的抗菌活性和抗菌稳定性, 得到的衍生肽 N1 在盐离子、血清和蛋白酶环境中均保持高稳定性^[18]。De Zotti 等^[19]设计得到含有 7 个 Aib 的衍生肽 heptaibin, 高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)分析发现 heptaibin 分别与糜蛋白酶和链霉蛋白酶 E 孵育 12 h 后, 肽段保持完整, 未表现出明显的蛋白水解迹象。之前的研究^[20-23]也证实了 Aib 在提高 AMPs 蛋白酶稳定性方面的有效性, 这可能是由于序列中 Aib 的含量较高(50%), 具有庞大的空间结构, 也有研究认为是 Aib 诱导的螺旋结构避免了蛋白酶的识别^[24-26]。

非天然氨基酸虽然能够显著提高 AMPs 蛋白酶稳定性, 但非天然氨基酸仅限于化学合成, 无法通过微生物表达实现。因此, 非天然氨基酸取代的实际应用还需要进一步探索。

2 化学修饰

2.1 聚乙二醇修饰

解决 AMPs 蛋白酶稳定性差的另一个常见策略是在肽链末端进行修饰。通过聚乙二醇化能够使得偶联物具有更好的热稳定性、蛋白酶稳定性和水溶性^[27]。Moreira 等^[28]将 AMPs LyeTx I-b (50 $\mu\text{mol}/\text{L}$)及聚乙二醇化后的衍生肽 LyeTx I-bPGE (50 $\mu\text{mol}/\text{L}$)与胰蛋白酶(1:50, 质量比)或蛋白酶 K (1:25, 质量比)在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育, 结果显示聚乙二醇修饰后的 AMPs LyeTx I-b 在 24 h 后保持完整, 而未经聚乙二醇修饰的 LyeTx I-b 在 6 h 后几乎被完全降解。Falciani 等^[29]将聚乙二醇偶联到分支肽 M33 的赖氨酸分支的 C 端, 得到四分支结构的 M33-Peg, 将 M33 及 M33-Peg 同时与铜绿假单胞菌弹性蛋白酶孵育 6 h 后, 采用 HPLC 和质谱(mass spectrometry, MS)分析其降解情况; HPLC 结果显示, M33 被完全水解, 而 M33-Peg 仅有小部分被水解;

MS 结果显示 M33 (4 683 Da)未出现相应的特征峰, 而 M33-Peg 在质谱图上显示出一个与完整肽分子量相对应的峰(4 858 Da), 经聚乙二醇修饰后的肽 M33-Peg 具有更好的蛋白酶稳定性。但是 Zhou 等^[30]设计了一种聚乙二醇脂肽 EK1C4 及其去聚乙二醇化的对应衍生物 EKL1C, 发现与聚乙二醇化脂肽 EK1C4 相比, 去聚乙二醇化肽 EKL1C 具有更好的蛋白酶稳定性。综上, 聚乙二醇修饰可能会在不同肽中产生不同效果, 而具体的聚乙二醇修饰策略需要进一步探究。

2.2 N 端乙酰化和 C 端酰胺化

AMPs 常见的化学修饰如 N 端乙酰化和 C 端酰胺化能够在一定程度上提高 AMPs 的蛋白酶稳定性, 特别是羧基酰胺, 还能够额外增加 AMPs 的正电荷而帮助提高杀菌作用^[31], 但是这 2 种修饰在提高 AMPs 蛋白酶稳定性方面存在一定的差异。Nguyen 等^[32]设计了 2 组富含精氨酸和赖氨酸的短肽, 研究其在血清中的稳定性以及抗菌活性; 研究发现, C 端酰胺化并不能提高肽对血清羧基肽酶的稳定性, 但 N 端乙酰化能够提高肽对血清氨基肽酶的稳定性。不同位置修饰增强血清稳定性的程度为 N 端乙酰化和 C 端酰胺化>N 端乙酰化>C 端酰胺化。Li 等^[33]将肽 L163 及其衍生物在 37 °C 胰蛋白酶中孵育 1 h 后, 通过最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)来评价多肽的抗酶解能力, 结果表明, 在 12 μg/mL 胰蛋白酶条件下 N 端乙酰化的肽 L163-AC 保持稳定, 但原肽失去抑菌活性。Strömstedt 等^[34]研究证明, 当 N 端乙酰化和 C 端酰胺化与色氨酸取代相结合时, 蛋白酶稳定性才会增强。Hausch 等^[35]研究表明, AMPs 的蛋白酶稳定性可能还取决于 AMPs 的疏水性程度, 疏水性越强则越难被蛋白酶水解。因此, N 端乙酰化和 C 端酰胺化在提高 AMPs

蛋白酶稳定性方面的效果不同, 且不同的肽修饰后的效果不同, 在使用时还需考虑 AMPs 的疏水性。

2.3 糖基化

糖基化作为常见的翻译后修饰策略, 在提高 AMPs 抑菌活性的同时能够增加肽的稳定性^[36-37]。Tortorella 等^[38]用 N-乙酰氨基葡萄糖取代来自蜜蜂毒液的 AMPs LL-III 中的 Asn 残基, 得到其糖基化形式 g-LL-III, 选择糜蛋白酶和胃蛋白酶进行体外酶解试验, 将荧光标记物 Ala-Ala-Phe-7-氨基-4-甲基香豆素作为肽 LL-III 和肽 g-LL-III 的竞争底物, 测定荧光强度随时间变化的曲线并通过分析曲线斜率判断多肽是否被水解, 结果表明, 同浓度下 LL-III 的起始曲线斜率明显降低而肽 g-LL-III 斜率显著增大, 说明 g-LL-III 有较好的抗酶解能力; 进一步测定多肽与糜蛋白酶和胃蛋白酶(100 nmol/L)孵育 15 min 及与 50% 胎牛血清孵育 24 h 后的 MIC 值来比较多肽修饰前后抗酶解能力的变化, 发现糖基化修饰能够增加肽对糜蛋白酶和胃蛋白酶的稳定性。此外 Dwivedi 等^[39]将 indolicidin (ILPWKWPWPWRR-NH₂) 中 9 号位的 Trp 替换为 β-糖基化后的 Thr, 并为了提高其疏水性将 Lys 替换为 Pro 得到衍生物 [βGlc-T9,K7]indolicidin, 通过 MIC 值判断多肽抗酶解能力发现, 糖基化之后其抗胰蛋白酶解能力不变, 但是溶血及毒性降低。因此, 糖基化修饰用以提高抗酶解能力的具体策略还要依据具体情况而定。

2.4 脂化

脂肽通常由线性或环状肽的氨基酸侧链或末端连接脂肪酸构成, 通常具有广谱抗菌活性, 而且具有较好的蛋白酶稳定性。Zhong 等^[40]在蜘蛛毒液分离出的肽 anoplin (GLLKRIKTLL-NH₂) 的 4 号或 7 号氨基酸引入不同长度的脂肪酸链后将其在 0.1–1.0 mg/mL 的胰蛋白酶中分别孵

育 1 h 和 6 h, 以 MIC 值来评价脂肽的抗酶解能力, 研究发现在 7 号氨基酸位置引入脂肪酸能赋予其更好的稳定性, 在引入长度为 8–10 个碳原子的脂肪酸时, 脂肽 MIC 逐渐降低, 但在引入长度为 12 个碳原子的脂肪酸链时脂肽的 MIC 值显著升高。同样地, Huang 等^[41]将不同长度的脂肪酸链引入蜂毒肽(melittin)的 N 端, 并与 0.2 mg/mL 的胃蛋白酶和胰蛋白酶分别孵育 6 h, 发现当脂肪酸链长度超过 10 个碳原子时, 与胰蛋白酶孵育脂肽降解率 <40%, 脂肪酸链长度超过 8 个碳原子时, 与胃蛋白酶孵育降解率 <20%, 并发现脂肪酸链长度在 2–10 个碳原子时抗菌活性显著增加, 超过 10 个碳原子后抗菌活性显著降低。因此, 随着脂肪酸链长度增加, 脂肽的抗酶解能力逐渐增强, 但随着脂肪酸链长度的增加脂肽的抗菌活性可能存在阈值。

3 合理规避酶切位点进行氨基酸重排

根据蛋白酶的作用位点对原始肽段内的氨基酸进行替换, 或者设计简短的肽段并进行重复从而获得高抗菌活性与稳定性的 AMPs 是抗酶解设计中的另一种有效方法。Kim 等^[42]设计了含有 15 个未经修饰的天然氨基酸的 AMPs, 并对这 15 个氨基酸的顺序进行了系统排列, 以规避蛋白酶的切割位点。为了限制胰蛋白酶对阳离子氨基酸在 C 端侧酰胺键的水解, 脯氨酸(P⁵)被放置在精氨酸(R⁴)的羧基侧, 酸性氨基酸谷氨酸(E¹²)或极性中性氨基酸谷氨酰胺(Q¹²)被放置在 2 个赖氨酸残基(K¹¹ 和 K¹³)之间。这是由于脯氨酸残基位于胰蛋白酶切割位点的羧基侧, 则不发生切割, 而如果切割位点两侧都有酸性残基, 则水解速率较慢^[43]。同时, 为了避免糜蛋白酶切割脂肪族氨基酸 C 端的酰胺键, 所以在 AMPs 的疏水面上

没有选择色氨酸和苯丙氨酸, 基于上述酶切位点设计出的 AMPs GNU6 (RIIRPIIQIKQKIR)和 GNU7 (RLLRPLLQLLKQKLR)对枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等具有较好的抑菌活性, 其 MIC 值在 2–4 mg/L^[44]。本课题组采用简约模板法建立了一个抗胰蛋白酶和糜蛋白酶的序列单元(XYPX)_n, 其中 X 为异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)或缬氨酸(Val); Y 为精氨酸(Arg)或赖氨酸(Lys), n 为重复单元数量^[45]。该序列模式在阳离子氨基酸(Arg 或 Lys)的 C 端侧放置脯氨酸(Pro)以阻断胰蛋白酶的水解; 在序列单元的两端放置不易被糜蛋白酶水解的疏水性氨基酸(Ile、Leu 和 Val), 经研究发现具有 7 个重复单元的(IRPI)₇对革兰氏阴性菌, 如大肠杆菌(*Escherichia coli*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)等有较好的抑菌效果, MIC 值为 1–4 μmol/L^[45]。此外, 本课题组还将酶切位点规避手段与末端疏水氨基酸修饰相结合, 进一步设计出序列模板 XX(XCRKPX)_nXX 其中 X 为 Ile 或 Val, n 为括号内序列重复次数; 该模板中 Arg N 端的半胱氨酸(Cys)和 C 端的赖氨酸(Lys)阻断了胰蛋白酶对 Arg C 端的作用, 而 Lys C 端的 Pro 阻断了胰蛋白酶对 Lys C 端的作用, 选择具有长脂肪侧链的 Ile 或 Val 提供必要的疏水力并规避糜蛋白酶以及胃蛋白酶的降解, 多肽 II-I₄-II (IICRKPIICRKPIICRKPIICRKPII-NH₂)对 *E. coli*、*S. aureus* 等具有较好的抑菌活性, 其 MIC 值为 2–8 μmol/L^[46]。

合理地排列天然氨基酸以避免或保护降解位点可能是提高 AMPs 蛋白酶稳定性同时降低 AMPs 生产成本的较佳选择。然而, 关于规避酶切位点进行氨基酸重排的研究较少, 且研究人员使用的酶浓度、酶活力单位不同会导致不同的研究结论, 因此天然氨基酸序列抗酶解效力的评定标准亟待统一^[47]。

4 环化

4.1 酰胺键与二硫键环化

酰胺键与二硫键环化能够减少游离氨基酸从而减少与蛋白酶的结合, 稳定肽的活性构象。此外, 二硫键成环还能减少环化的能量消耗^[48]。相较于线性肽, 环化后的肽能形成稳定的二级结构使 AMPs 具有较高的蛋白酶稳定性。酰胺键环化是提高线性 AMPs 稳定性的有效方法。Gunasekera 等^[49]在对 LL-37 的超短肽段 KR-12 的研究中发现, 与单体 KR-12 相比, 由 2-4 个氨基酸连接环化的 KR-12 二聚体具有更好的抗菌活性和更高的血清稳定性。Zhao 等^[50]用肽环化酶 Butelase 1 催化线性 AMPs GKE 进行主链头尾环化得到 cGKE, 通过与胃蛋白酶与胰蛋白酶孵育发现, GKE 在胃蛋白酶处理 3 min 后降解 90% 而 cGKE 仅降解 50%, GKE 在胰蛋白酶中 15 min 几乎完全降解, 而 cGKE 降解率仅有 20%。具有二硫键的天然 AMPs 有更好的稳定性, Nehls 等^[51]在二硫键对防御素的抗酶解能力研究中发现, 具有 3 个分子内二硫键的人天然防御素 β -3 在胰蛋白酶孵育 5 min 后仅降解 18.7%, 相比之下含 1 个二硫键的防御素变体降解 77%, 不含二硫键的线性防御素变体降解了 87%。Dolle 等^[52]将蛙皮肤分泌的 AMPs temporin-SHf 以及 4 号位、7 号位突变为 Cys 的环化肽与人血清或胰蛋白酶孵育后, 发现突变体具有更好的抗酶解能力。以上研究表明 AMPs 的抗酶解能力与肽内是否存在二硫键以及二硫键的数量有关。

4.2 环型蛋白酶抑制剂杂合

环型蛋白酶抑制剂不仅能够赋予 AMPs 更大的空间位阻以减少酶的识别, 还能够抑制相关蛋白酶活性以进一步降低降解率。向日葵胰蛋白酶抑制剂 1 (SFTI-1) 中包含环型骨架和 1 对

二硫键^[53], 研究表明, 二硫键和环形骨架的氢键网对于提高 AMPs 二级结构稳定性具有重要的意义^[54]。本课题组将 SFTI-1 的胰蛋白酶结合环 N 端的半胱氨酸与全新设计 AMPs 的 C 端氨基酸通过酰胺键连接, 设计出一系列肽, 发现该策略提高了 AMPs 在胰蛋白酶、胃蛋白酶及木瓜蛋白酶中的稳定性^[55]。Koebach 等^[56]将线性肽 optP7 嫁接到南瓜家族具有胰蛋白酶抑制活性的环蛋白 MCoTI-II 的环 6 中, 结果表明, 嫁接的环肽在人血清中孵育 24 h 后仍保留 30%, 而线性肽 optP7 在 1 h 后被完全降解, 其半衰期也明显低于嫁接环肽。

4.3 钉合

肽钉合技术是在肽的端链或侧链通过共价连接 2 个氨基酸的侧链, 从而形成装订肽并约束其 α -螺旋构象, 进而赋予肽对酶的抗性并增强其生物活性^[57]。本课题组^[58]设计了一种 α -螺旋全烃类 AMPs stRRL, 其中 2 号位和 6 号位的 (S)-2-(4-戊烯基)丙氨酸进行侧链交联成环; stRRL 在 2 mg/mL 的胰蛋白酶或糜蛋白酶作用 2 h 后仍保持较好的对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的抗菌活性, 其原因可能是主链环化增加了空间位阻, 阻碍了蛋白酶与肽骨架的结合。Zeng 等^[59]将肽 RStAMPs 的 Pro 和 Lys 进行钉合, 钉合后的肽对糜蛋白酶及胃蛋白酶有较好的稳定性。Luong 等^[60]将天然 AMPs polybia-MP1 中 $i/i+4$ 位上连接的烯烃短链通过异裂作用钉合, 合成钉合肽 MPIS, 之后在 8 号位将天冬氨酸(Asp)替换为天冬酰胺(Asn)设计出 MPIS-D8N, 在 12 号位将谷氨酰胺(Gln)替换为赖氨酸(Lys)设计出 MPIS-Q12K, 结果表明 3 种钉合肽均增加了溶血活性, 但在胰蛋白酶消化实验中, MPIS-Q12K 的半衰期为 1 446 min, 而天然肽 polybia-MP1 半衰期仅有 21 min。

钉合技术的引入能增强 AMPs 的结构稳定

性、蛋白水解稳定性和抗菌活性,但大多数钉合的 AMPs 具有较高的溶血活性^[61-62]。

5 纳米肽

5.1 自组装纳米肽

在过去几十年中,分子自组装领域取得了许多进展,这一领域通常用于指导特定功能生物材料的设计和合成^[63-65]。AMPs 的自组装被认为是提高其蛋白酶稳定性的一种有效方法,常用的方法有引入脂肪酸、聚乙二醇等一些聚合物基质材料。

部分阳离子脂肽可通过疏水力驱动自组装,从而拥有较好的抗酶解能力。Han 等^[66]将青蛙皮肤分泌的由 18 个氨基酸组成的抗菌肽 figainin 1 (F1)在 N 端连接葵酸合成脂肽 A-10,脂肪酸链能促进疏水脂肽自组装成纳米结构,A-10 经过蛋白酶 K 处理 24 h 后仍有 43%未被降解,而未经脂肪酸修饰的 F1 则只有 6%未被降解。本课题组将十六烷酸作为抗菌肽自组装的驱动脂肪酸,以甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(GGG)柔性氨基酸作为连接体,精氨酸-脯氨酸(RP)重复作为分支设计了树突状自组装纳米粒子(SPDNs),C₁₆-2RP、C₁₆-3RP 纳米颗粒,在 8 mg/mL 胰蛋白酶或糜蛋白酶作用下 MIC 值基本不受影响^[67]。引入脂肪酸能够在一定程度上提高抗菌活性,但是脂化会导致水溶性下降、毒性升高。因此,在采用这种修饰方法时,可以通过适当调节脂肪酸链组成与长度使 AMPs 达到抗菌活性、生物相容性和蛋白水解稳定性的平衡^[68-69]。

聚乙二醇不仅可以用于末端修饰,还能够作为纳米结构自组装的驱动力。本实验室将猪源抗菌肽 PG-1 的 N 末端进行聚乙二醇修饰,合成了 NPG_n,使其能自主装成纳米束状结构,将 512 μg/mL 的肽与不同浓度的胰蛋白酶连续孵育 1-8 h,结果显示 PG-1 在与 1 mg/mL 的胰

蛋白酶孵育后完全失活而 NPG_n 在不同浓度胰蛋白酶作用 8 h 后抑菌活性无明显变化^[70]。

此外,Zhou 等^[71]将带负电荷的谷氨酸(Glu)和天冬酰胺(Asn)添加到肽 PTP-7 (FLGALFKALSKLL)的 C 端或 N 端,构建了 2 种自组装肽 EN(ENFLGALFKALSKLL)和 NE(FLGALFKALSKLLNE),这 2 种衍生肽能组装成不同的纳米结构。PTP-7 在 10%血清中的半衰期约为 10 h;EN 在 10%血清中的半衰期约为 24 h,而 NE 在与 10%血清孵育 24 h 后仍有大量完整的肽段(>90%)^[72]。这表明 NE 比 EN 更稳定,这可能是因为 EN 分子容易从形成的纳米纤维中释放出来。

自组装 AMPs 蛋白酶稳定性高的原因可能是通过自组装的方式造成空间位阻效应从而有效保护切割位点,降低蛋白酶对自组装肽的亲合力^[73]。

5.2 肽和金属纳米粒子的结合

阳离子 AMPs 和金属纳米粒子的结合使得 AMPs 中酶切位点与蛋白酶之间具有更大的空间位阻,也被认为是一种有效提高 AMPs 蛋白酶稳定性和抗菌活性的策略。Wadhvani 等^[74]研究了 AMPs 与金纳米粒子的结合,研究选择了 5 种具有代表性的两亲性 α-螺旋 AMPs 与金纳米粒子结合;AMPs 与金纳米粒子结合后,经过 24 h 的胰蛋白酶(50 μg/mL)处理后,纳米肽几乎没有被水解,而游离肽在胰蛋白酶处理 30 min 时,有约 95%的肽段被水解。Maraming 等^[75]将聚乙二醇化后的金纳米颗粒与 KT2 (NGVQPKYKWWKWWKWW-NH₂)相偶联,通过比较游离肽与结合肽酶稳定性发现,与金纳米颗粒结合的肽抵抗的胰蛋白酶浓度比游离肽抵抗的胰蛋白酶浓度高至少 32 倍。这些研究表明,与金纳米粒子相连的纳米肽是解决 AMPs 蛋白酶稳定性低的一种有效方法。

6 小结与展望

引入非天然氨基酸、末端修饰、合理规避酶切位点进行氨基酸重排、环化、纳米肽的设计均能在一定程度上提高 AMPs 的酶稳定性, 这些化学手段或药物载体(聚合物以及自组装系统)的使用都屏蔽了酶切位点从而减少了 AMPs 的降解, 在实际应用中各有利弊, 可以根据 AMPs 具体应用目的进行调整。需要注

意的是, 目前抗酶解 AMPs 的研究中, 没有统一的抗酶解评定标准, 酶浓度、酶单位、酶活力、酶处理时间的不统一均会对评估结果产生一定的影响(表 1)。同时大多数实验忽略了体内的复杂情况, 血清中多种酶以及盐离子的共同作用对于 AMPs 稳定性有着更高的要求。因此, 在后续研究中需要模拟体内复杂环境, 应用仿生消化液及体内药代动力学综合评价 AMPs 的抗酶解效果和体内外半衰期, 以促进 AMPs

表 1 抗菌肽的抗酶解策略

Table 1 Anti-enzymatic strategies of antimicrobial peptides

Anti-enzyme methods	Peptides	Type and concentration of enzyme	Other stability tests	References
Incorporation of unnatural amino acids	Pin2	Peptides: trypsin ratio of 1:20 (W/W) Peptides: elastase ratio of 1:20 (W/W)	Serum stability	[12]
	UNA-12	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ trypsin, proteinase K	Serum and salt ion stability	[14]
	U1-2WD	10 mg/mL trypsin	ND	[16]
Chemical modifications	LyeTx I-bPGE	Peptides: trypsin ratio of 1:50 (W/W) Peptides: proteinase K ratio of 1:25 (W/W)	ND	[28]
	L163-AC	12, 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ trypsin	Plasma, pH, and thermal stability	[33]
	g-LL-III	100 nmol/L pepsin, chymotrypsin	Serum stability	[38]
	Anoplin	0.1–1.0 mg/mL trypsin	Salts, serum, and pH stability	[40]
Rational avoidance of protease cleavage sites	GNU6/GNU7	Peptide: chymotrypsin molar ratio of 2 500:1 Peptide: trypsin molar ratio of 5 000:1	ND	[42]
	R7I	0.125–4 mg/mL trypsin, chymotrypsin	Salts and serum stability	[45]
	II-I ₄ -II	0.062 5–2 mg/mL pepsin, chymotrypsin, proteinase K, trypsin	Salts, serum, acid, alkali, and heat stability	[46]
Cyclization	HBD-3 variants	Peptides: trypsin ratio of 1:100, 1:1 000, 1:10 000 (W/W)	ND	[51]
	RV3	0.25–2 mg/mL trypsin, pepsin and papain	Serum, thermal, pH stability	[55]
	Helix-distorted RStAMPs	0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chymotrypsin, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pepsin	ND	[59]
	MPIS	0.6 $\mu\text{mol}/\text{L}$ trypsin	ND	[60]
Nano peptide design	SPDNs	2, 4, 8 mg/mL trypsin, chymotrypsin	Salts and serum stability	[67]
	PFNP	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ trypsin	ND	[74]

ND means undetected.

的临床应用或动物饲用。相信随着抗酶解 AMPs 的构效解析和研究方法的不断创新, AMPs 可以更好地应用于制药、畜牧、食品防腐等领域。

REFERENCES

- [1] MAGANA M, PUSHANATHAN M, SANTOS AL, LEANSE L, FERNANDEZ M, IOANNIDIS A, GIULIANOTTI MA, APIDIANAKIS Y, BRADFUTE S, FERGUSON AL, CHERKASOV A, SELEEM MN, PINILLA C, DE LA FUENTE-NUNEZ C, LAZARIDIS T, DAI TH, HOUGHTEN RA, HANCOCK REW, TEGOS GP. The value of antimicrobial peptides in the age of resistance[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2020, 20(9): e216-e230.
- [2] SHAO CX, TIAN HT, WANG TY, WANG ZH, CHOU SL, SHAN AS, CHENG BJ. Central β -turn increases the cell selectivity of imperfectly amphipathic α -helical peptides[J]. *Acta Biomaterialia*, 2018, 69: 243-255.
- [3] WANG JJ, CHOU SL, YANG ZY, YANG Y, WANG ZH, SONG J, DOU XJ, SHAN AS. Combating drug-resistant fungi with novel imperfectly amphipathic palindromic peptides[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 61(9): 3889-3907.
- [4] CHEN RN, MAO YM, WANG J, LIU M, QIAO Y, ZHENG LB, SU YQ, KE QZ, ZHENG WQ. Molecular mechanisms of an antimicrobial peptide piscidin (Ic-pis) in a parasitic protozoan, cryptocaryon irritans[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 192.
- [5] GUI L, ZHANG PP, ZHANG QY, ZHANG JB. Two hepcidins from spotted scat (*Scatophagus argus*) possess antibacterial and antiviral functions *in vitro*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 50: 191-199.
- [6] 姜宇, 李秀, 林瑛. 利用 ELP-Intein 系统在大肠杆菌中生产抗菌肽 DLP4[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(6): 2365-2376.
JIANG Y, LI X, LIN Y. Production of antimicrobial peptide DLP4 in *Escherichia coli* using an ELP-Intein system[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(6): 2365-2376 (in Chinese).
- [7] LYU YF, YANG Y, LYU XT, DONG N, SHAN AS. Antimicrobial activity, improved cell selectivity and mode of action of short pmap-36-derived peptides against bacteria and candida[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 27258.
- [8] MA Z, WEI DD, YAN P, ZHU X, SHAN AS, BI ZP. Characterization of cell selectivity, physiological stability and endotoxin neutralization capabilities of α -helix-based peptide amphiphiles[J]. *Biomaterials*, 2015, 52: 517-530.
- [9] ECKERT R. Road to clinical efficacy: challenges and novel strategies for antimicrobial peptide development[J]. *Future Microbiology*, 2011, 6(6): 635-651.
- [10] PESCHEL A, SAHL HG. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4: 529-536.
- [11] ONG ZY, WIRADHARMA N, YANG YY. Strategies employed in the design and optimization of synthetic antimicrobial peptide amphiphiles with enhanced therapeutic potentials[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2014, 78: 28-45.
- [12] CARMONA G, RODRIGUEZ A, JUAREZ D, CORZO G, VILLEGAS E. Improved protease stability of the antimicrobial peptide pin2 substituted with D-amino acids[J]. *The Protein Journal*, 2013, 32(6): 456-466.
- [13] PAPO N, OREN Z, PAG U, SAHL HG, SHAI Y. The consequence of sequence alteration of an amphipathic alpha-helical antimicrobial peptide and its diastereomers[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(37): 33913-33921.
- [14] DEWANGAN RP, BISHT GS, SINGH VP, YAR MS, PASHA S. Design and synthesis of cell selective α/β -diastereomeric peptidomimetic with potent *in vivo* antibacterial activity against methicillin resistant *S. aureus*[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2018, 76: 538-547.
- [15] DE LUCIO H, GAMO AM, RUIZ-SANTAQUITERIA M, DE CASTRO S, SÁNCHEZ-MURCIA PA, TORO MA, GUTIÉRREZ KJ, GAGO F, JIMÉNEZ-RUIZ A, CAMARASA MJ, VELÁZQUEZ S. Improved proteolytic stability and potent activity against *Leishmania infantum* trypanothione reductase of α/β -peptide foldamers conjugated to cell-penetrating peptides[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, 140: 615-623.
- [16] HE SQ, YANG ZY, LI XF, WU H, ZHANG LC, WANG JJ, SHAN AS. Optimized proteolytic resistance motif (DabW)-based U1-2WD: a membrane-induced self-aggregating peptide to trigger bacterial agglutination and death[J]. *Acta Biomaterialia*, 2022, 153: 540-556.
- [17] KNAPPE D, HENKLEIN P, HOFFMANN R, HILPERT K. Easy strategy to protect antimicrobial peptides from fast degradation in serum[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, 54(9): 4003-4005.
- [18] HE SQ, YANG ZY, LI XF, WU H, ZHANG LC, SHAN AS, WANG JJ. Boosting stability and therapeutic potential of proteolysis-resistant antimicrobial peptides

- by end-tagging β -naphthylalanine[J]. *Acta Biomaterialia*, 2023, 164: 175-194.
- [19] DE ZOTTI M, BIONDI B, PEGGION C, PARK Y, HAHM KS, FORMAGGIO F, TONIOLO C. Synthesis, preferred conformation, protease stability, and membrane activity of heptaibin, a medium-length peptaibiotic[J]. *Journal of Peptide Science: an Official Publication of the European Peptide Society*, 2011, 17(8): 585-594.
- [20] NGUYEN HH, IMHOF D, KRONEN M, SCHLEGEL B, HÄRTL A, GRÄFE U, GERA L, REISSMANN S. Synthesis and biological evaluation of analogues of the peptaibol ampullosporin A[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2002, 45(13): 2781-2787.
- [21] YAMAGUCHI H, KODAMA H, OSADA S, KATO F, JELOKHANI-NIARAKI M, KONDO M. Effect of alpha, alpha-dialkyl amino acids on the protease resistance of peptides[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2003, 67(10): 2269-2272.
- [22] SADOWSKY JD, MURRAY JK, TOMITA Y, GELLMAN SH. Exploration of backbone space in foldamers containing alpha- and beta-amino acid residues: developing protease-resistant oligomers that bind tightly to the BH3-recognition cleft of Bcl-xL[J]. *Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology*, 2007, 8(8): 903-916.
- [23] DE ZOTTI M, BIONDI B, FORMAGGIO F, TONIOLO C, STELLA L, PARK Y, HAHM KS. Trichogin GA IV: an antibacterial and protease-resistant peptide[J]. *Journal of Peptide Science: an Official Publication of the European Peptide Society*, 2009, 15(9): 615-619.
- [24] KARLE IL, BALARAM P. Structural characteristics of alpha-helical peptide molecules containing Aib residues[J]. *Biochemistry*, 1990, 29(29): 6747-6756.
- [25] DI BLASIO B, PAVONE V, SAVIANO M, LOMBARDI A, NASTRI F, PEDONE C, BENEDETTI E, CRISMA M, ANZOLIN M, TONIOLO C. Structural characterization of the beta-bend ribbon spiral: crystallographic analysis of two long (L-Pro-Aib) $_n$ sequential peptides[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1992, 114(16): 6273-6278.
- [26] TONIOLO C, CRISMA M, FORMAGGIO F, PEGGION C. Control of peptide conformation by the Thorpe-Ingold effect (C alpha-tetrasubstitution)[J]. *Biopolymers*, 2001, 60(6): 396-419.
- [27] SANTOS JHPM, TORRES-OBREQUE KM, MENEGUETTI GP, AMARO BP, RANGEL-YAGUI CO. Protein pegylation for the design of biobetters: From reaction to purification processes[J]. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 54: e01009.
- [28] MOREIRA BRITO JC, CARVALHO LR, NEVES DE SOUZA A, CARNEIRO G, MAGALHÃES PP, FARIAS LM, GUIMARÃES NR, VERLY RM, RESENDE JM, ELENA DE LIMA M. PEGylation of the antimicrobial peptide LyeTx I-b maintains structure-related biological properties and improves selectivity[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2022, 9: 1001508.
- [29] FALCIANI C, LOZZI L, SCALI S, BRUNETTI J, BRACCI L, PINI A. Site-specific pegylation of an antimicrobial peptide increases resistance to *Pseudomonas aeruginosa* elastase[J]. *Amino Acids*, 2014, 46(5): 1403-1407.
- [30] ZHOU J, XU W, LIU ZZ, WANG C, XIA S, LAN QS, CAI YX, SU S, PU J, XING LX, XIE YH, LU L, JIANG SB, WANG Q. A highly potent and stable pan-coronavirus fusion inhibitor as a candidate prophylactic and therapeutic for COVID-19 and other coronavirus diseases[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2022, 12(4): 1652-1661.
- [31] TAN P, LAI ZH, JIAN Q, SHAO CX, ZHU YJ, LI GY, SHAN AS. Design of heptad repeat amphiphiles based on database filtering and structure-function relationships to combat drug-resistant fungi and biofilms[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(2): 2129-2144.
- [32] NGUYEN LT, CHAU JK, PERRY NA, DE BOER L, ZAAT SAJ, VOGEL HJ. Serum stabilities of short tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptide analogs[J]. *PLoS One*, 2010, 5(9): e12684.
- [33] LI DD, YANG YH, LI RF, HUANG L, WANG ZC, DENG QW, DONG SB. N-terminal acetylation of antimicrobial peptide L163 improves its stability against protease degradation[J]. *Journal of Peptide Science: an Official Publication of the European Peptide Society*, 2021, 27(9): e3337.
- [34] STRÖMSTEDT AA, PASUPULETI M, SCHMIDTCHEN A, MALMSTEN M. Evaluation of strategies for improving proteolytic resistance of antimicrobial peptides by using variants of EFK17, an internal segment of LL-37[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53(2): 593-602.
- [35] HAUSCH F, SHAN L, SANTIAGO NA, GRAY GM, KHOSLA C. Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides[J]. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2002, 283(4): G996-G1003.

- [36] LI WY, SEPAROVIC F, O'BRIEN-SIMPSON NM, WADE JD. Chemically modified and conjugated antimicrobial peptides against superbugs[J]. *Chemical Society Reviews*, 2021, 50(8): 4932-4973.
- [37] HUANG W, GROOTHUYS S, HEREDIA A, KUIJPERS BHM, RUTJES FPJT, van DELFT FL, WANG LX. Enzymatic glycosylation of triazole-linked GlcNAc/Glc-peptides: synthesis, stability and anti-HIV activity of triazole-linked HIV-1 gp41 glycopeptide C34 analogues[J]. *Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology*, 2009, 10(7): 1234-1242.
- [38] TORTORELLA A, LEONE L, LOMBARDI A, PIZZO E, BOSSO A, WINTER R, PETRACCONE L, DEL VECCHIO P, OLIVA R. The impact of n-glycosylation on the properties of the antimicrobial peptide LL-III[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 3733.
- [39] DWIVEDI R, AGGARWAL P, BHAVESH NS, KAUR KJ. Design of therapeutically improved analogue of the antimicrobial peptide, indolicidin, using a glycosylation strategy[J]. *Amino Acids*, 2019, 51(10): 1443-1460.
- [40] ZHONG C, ZHU NY, ZHU YW, LIU TQ, GOU SH, XIE JQ, YAO J, NI JM. Antimicrobial peptides conjugated with fatty acids on the side chain of D-amino acid promises antimicrobial potency against multidrug-resistant bacteria[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 2020, 141: 105123.
- [41] HUANG S, SU GQ, JIANG S, CHEN L, HUANG JX, YANG FY. New N-terminal fatty-acid-modified melittin analogs with potent biological activity[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(2): 867.
- [42] KIM H, JANG JH, KIM SC, CHO JH. *De novo* generation of short antimicrobial peptides with enhanced stability and cell specificity[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2014, 69(1): 121-132.
- [43] CRAIK CS, LARGMAN C, FLETCHER T, ROCZNAK S, BARR PJ, FLETTERICK R, RUTTER WJ. Redesigning trypsin: alteration of substrate specificity[J]. *Science*, 1985, 228(4697): 291-297.
- [44] HARRIS JL, BACKES BJ, LEONETTI F, MAHRUS S, ELLMAN JA, CRAIK CS. Rapid and general profiling of protease specificity by using combinatorial fluorogenic substrate libraries[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(14): 7754-7759.
- [45] WANG JJ, SONG J, YANG ZY, HE SQ, YANG Y, FENG XJ, DOU XJ, SHAN AS. Antimicrobial peptides with high proteolytic resistance for combating Gram-negative bacteria[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 62(5): 2286-2304.
- [46] ZHU YJ, SHAO CX, LI GY, LAI ZH, TAN P, JIAN Q, CHENG BJ, SHAN AS. Rational avoidance of protease cleavage sites and symmetrical end-tagging significantly enhances the stability and therapeutic potential of antimicrobial peptides[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2020, 63(17): 9421-9435.
- [47] SHAO CX, ZHU YJ, LAI ZH, TAN P, SHAN AS. Antimicrobial peptides with protease stability: progress and perspective[J]. *Future Medicinal Chemistry*, 2019, 11(16): 2047-2050.
- [48] LOURENÇO ALP, RIOS TB, DA SILVA ÁP, FRANCO OL, RAMADA MHS. Peptide stapling applied to antimicrobial peptides[J]. *Antibiotics*, 2023, 12(9): 1400.
- [49] GUNASEKERA S, MUHAMMAD T, STRÖMSTEDT AA, ROSENGREN KJ, GÖRANSSON U. Backbone cyclization and dimerization of LL-37-derived peptides enhance antimicrobial activity and proteolytic stability[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 168.
- [50] ZHAO JS, GE G, HUANG YB, HOU Y, HU SQ. Butelase 1-mediated enzymatic cyclization of antimicrobial peptides: improvements on stability and bioactivity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(50): 15869-15878.
- [51] NEHLS C, BÖHLING A, PODSCHUN R, SCHUBERT S, GRÖTZINGER J, SCHROMM A, FEDDERS H, LEIPPE M, HARDER J, KACONIS Y, GRONOW S, GUTSMANN T. Influence of disulfide bonds in human beta defensin-3 on its strain specific activity against Gram-negative bacteria[J]. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*, 2020, 1862(8): 183273.
- [52] DOLLE A, NAGATI VB, HUNASHAL Y, KRISHNAMURTHY K, PASUPULATI AK, RAGHOTHAMA S, GOWD KH. Disulfide engineering on temporin-SHf: stabilizing the bioactive conformation of an ultra-short antimicrobial peptide[J]. *Chemical Biology & Drug Design*, 2019, 94(3): 1634-1646.
- [53] LUCKETT S, GARCIA RS, BARKER JJ, KONAREV AV, SHEWRY PR, CLARKE AR, BRADY RL. High-resolution structure of a potent, cyclic proteinase inhibitor from sunflower seeds[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 290(2): 525-533.
- [54] KORSINCZKY MLJ, SCHIRRA HJ, CRAIK DJ. Sunflower trypsin inhibitor-1[J]. *Current Protein &*

- Peptide Science, 2004, 5(5): 351-364.
- [55] WANG CS, SHAO CX, FANG YX, WANG JJ, DONG N, SHAN AS. Binding loop of sunflower trypsin inhibitor 1 serves as a design motif for proteolysis-resistant antimicrobial peptides[J]. *Acta Biomaterialia*, 2021, 124: 254-269.
- [56] KOEHBACH J, GANI J, HILPERT K, CRAIK DJ. Comparison of a short linear antimicrobial peptide with its disulfide-cyclized and cyclotide-grafted variants against clinically relevant pathogens[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(6): 1249.
- [57] JING XS, JIN K. A gold mine for drug discovery: strategies to develop cyclic peptides into therapies[J]. *Medicinal Research Reviews*, 2020, 40(2): 753-810.
- [58] SHAO CX, JIAN Q, LI BW, ZHU YJ, YU WK, LI ZY, SHAN AS. Ultrashort all-hydrocarbon stapled α -helix amphiphile as a potent and stable antimicrobial compound[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2023, 66(16): 11414-11427.
- [59] ZENG ZZ, ZHU JB, DENG XY, CHEN HW, JIN Y, MICLET E, ALEZRA V, WAN Y. Customized reversible stapling for selective delivery of bioactive peptides[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2022, 144(51): 23614-23621.
- [60] LUONG HX, KIM DH, LEE BJ, KIM YW. Antimicrobial activity and stability of stapled helices of polybia-MP1[J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2017, 40(12): 1414-1419.
- [61] YOU YH, LIU HY, ZHU YZ, ZHENG H. Rational design of stapled antimicrobial peptides[J]. *Amino Acids*, 2023, 55(4): 421-442.
- [62] HIRANO M, SAITO C, YOKOO H, GOTO C, KAWANO R, MISAWA T, DEMIZU Y. Development of antimicrobial stapled peptides based on Magainin 2 sequence[J]. *Molecules*, 2021, 26(2): 444.
- [63] WHITESIDES GM, GRZYBOWSKI B. Self-assembly at all scales[J]. *Science*, 2002, 295(5564): 2418-2421.
- [64] ZHANG SG. Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21: 1171-1178.
- [65] GAZIT E. Molecular self-assembly: searching sequence space[J]. *Nature Chemistry*, 2015, 7(1): 14-15.
- [66] HAN ZB, FENG DM, WANG WX, WANG Y, CHENG MS, YANG HL, LIU Y. Influence of fatty acid modification on the anticancer activity of the antimicrobial peptide figainin 1[J]. *ACS Omega*, 2023, 8(44): 41876-41884.
- [67] LAI ZH, JIAN Q, LI GY, SHAO CX, ZHU YJ, YUAN XJ, CHEN HY, SHAN AS. Self-assembling peptide dendron nanoparticles with high stability and a multimodal antimicrobial mechanism of action[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(10): 15824-15840.
- [68] LIU TQ, ZHU NY, ZHONG C, ZHU YW, GOU SH, CHANG LL, BAO HX, LIU H, ZHANG Y, NI JM. Effect of N-methylated and fatty acid conjugation on analogs of antimicrobial peptide Anoplin[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2020, 152: 105453.
- [69] CHU-KUNG AF, NGUYEN R, BOZZELLI KN, TIRRELL M. Chain length dependence of antimicrobial peptide-fatty acid conjugate activity[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2010, 345(2): 160-167.
- [70] YU WK, WANG JJ, WANG ZH, LI LX, LI WY, SONG J, ZHANG SS, SHAN AS. PEGylation of the antimicrobial peptide PG-1: a link between propensity for nanostructuring and capacity of the antitrypsin hydrolytic ability[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, 64(14): 10469-10481.
- [71] ZHOU XR, CAO YM, ZHANG Q, TIAN XB, DONG H, CHEN L, LUO SZ. Self-assembly nanostructure controlled sustained release, activity and stability of peptide drugs[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2017, 528(1-2): 723-731.
- [72] CHEN L, TU ZG, VOLOSHCHUK N, LIANG JF. Lytic peptides with improved stability and selectivity designed for cancer treatment[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, 101(4): 1508-1517.
- [73] TIAN XB, SUN FD, ZHOU XR, LUO SZ, CHEN L. Role of peptide self-assembly in antimicrobial peptides[J]. *Journal of Peptide Science*, 2015, 21(7): 530-539.
- [74] WADHWANI P, HEIDENREICH N, PODEYN B, BÜRCK J, ULRICH AS. Antibiotic gold: tethering of antimicrobial peptides to gold nanoparticles maintains conformational flexibility of peptides and improves trypsin susceptibility[J]. *Biomaterials Science*, 2017, 5(4): 817-827.
- [75] MARAMING P, DADUANG J, KAH JCY. Conjugation with gold nanoparticles improves the stability of the KT2 peptide and maintains its anticancer properties[J]. *RSC Advances*, 2022, 12(1): 319-325.

(本文责编 陈宏宇)