DOI:10.16016/j.1000-5404.202003346

抗菌肽 ET12 对革兰阳性菌的抗菌活性及机制研究

袁 慊,冯 伟,王 瑜,姚 璞,孙凤军 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院药剂科

[**摘要**] **目的** 研究抗菌肽 ET12 的抗菌活性及机制。**方法** 通过微量肉汤稀释法检测抗菌肽 ET12 对临床常见菌株的最低抑菌浓度(MIC),激光共聚焦显微镜观察抗菌肽 ET12 对表皮葡萄球菌生物膜形成和细胞膜通透性的影响,透射电镜观察抗菌肽 ET12 对表皮葡萄球菌细胞形态的影响,利用脱纤维绵羊血检测抗菌肽 ET12 的溶血活性,利用 CCK-8 试剂盒检测抗菌肽 ET12 对细胞的毒性。**结果** 抗菌肽 ET12 对革兰阳性菌特别是表皮葡萄球菌具有良好的抗菌活性,MIC 值在 8~64 μg/mL 之间。ET12 能够有效抑制表皮葡萄球菌生物膜的形成及破坏细菌细胞形态,增强细胞膜通透性。在有效抗菌浓度范围内,ET12 对绵羊红细胞的溶血率小于 2.5%,RAW264.7 细胞存活率大于 80%。**结论** 抗菌肽 ET12 对革兰阳性菌具有较强的抗菌活性,细胞膜可能是其抗菌作用靶点,且溶血活性和细胞毒性较低。

[**关键词**] 抗菌肽;革兰阳性菌;生物膜;细胞毒性

[**中图法分类号**] R378; R965; R977.6 [**文献标志码**] A

Antibacterial activity and mechanism of antimicrobial peptide ET12 against Gram-positive bacteria

YUAN Qian, FENG Wei, WANG Yu, YAO Pu, SUN Fengjun Department of Pharmacy, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To study the antibacterial activity and mechanism of antimicrobial peptide ET12. **Methods** The minimal inhibitory concentration (MIC) of ET12 on clinical common strains was determined by broth dilution method. The effect of ET12 on the biofilm formation and membrane permeability of *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) was observed by confocal laser microscopy. The effect of ET12 on the cell morphology was observed by transmission electron microscopy. Defibrillation sheep blood was used to detect the hemolytic activity of ET12. Cell counting Kit-8 assay was used to detect the cytotoxicity of ET12. **Results** ET12 had good antibacterial activity against Gram-positive bacteria, especially *S. epidermidis*. The MIC values of ET12 against Gram-positive bacteria were between 8 and 64 μg/mL. ET12 could inhibit the biofilm formation of *S. epidermidis*, damage the bacterial morphology and enhance cell membrane permeability. Within the effective concentration ranges of antibacterial activity, the hemolysis rate of ET12 on sheep red blood cells was less than 2.5%, and the survival rate of RAW264.7 cells was above 80%. **Conclusion** ET12 has strong antibacterial activity against Gram-positive bacteria, with the cell membrane as target, and has low hemolytic activity and cytotoxicity.

[**Key words**] antimicrobial peptide; Gram-positive bacteria; biofilm; cytotoxicity

Supported by the National Key R&D Plan of China (2017YFC1200400). Corresponding author: SUN Fengjun, E-mail: fengj_sun@163.com

[**基金项目**] 国家重点研发计划项目(2017YFC1200400)

[**通信作者**] 孙凤军,E-mail: fengj_sun@163.com

在过去几十年中,多药耐药菌迅速蔓延,导致医院感染和住院死亡率增加,对全球健康构成威胁。随着抗生素耐药性的上升,寻找替代性抗生素已成为治疗耐药菌的首要任务。抗菌肽(antimicrobial peptides,AMPs)存在于从细菌到植物、脊椎动物和无脊椎动物的所有生命形式中,是其固有免疫防御的普遍组成部分,已经被广泛研究。由于抗菌谱广、热稳定性好、对宿主毒性小等特征,抗菌肽具有作为抗菌药物使用的潜力[1-3];此外,大多数抗菌药物通常作用于特定蛋白质,而抗菌肽大多作用于细菌膜或其他广义靶点,使得细菌通过基因突变获得耐药性的可能性变得很小[4]。

抗菌肽是病原微生物入侵有机体后,有机体产生的一种具有抗菌作用的小分子多肽。从来源上分类,可分为内源性抗菌肽和人工合成抗菌肽两类。内源性抗菌肽是从有机体中直接提取的,具有广谱抗菌能力[5]。人工合成的抗菌肽主要是为了解决内源性抗菌肽产量小、技术难度高、新陈代谢稳定率和生物药效率低等问题而设计和改造的[6]。我们根据粪肠球菌产生的肠毒素中的一段氨基酸序列[7],在保证有较好抗菌活性的基础上,尽可能减小分子量,设计出3条具有9~12个氨基酸的多肽,经前期实验比较发现含有12个氨基酸残基的抗菌肽ET12对革兰阳性菌、特别是表皮葡萄球菌抗菌效果较好。因此,本研究拟通过调查其抗菌活性、抗生物膜形成能力、细胞毒性、溶血性,从而确定ET12是一种可应用的、效果良好的抗革兰阳性菌活性肽;并在此基础上,通过透射电子显微镜和激光共聚焦显微镜观察抗菌肽处理前后细菌形态和细胞膜通透性的变化,初步探究抗菌肽ET12的抗菌机制,以期为开发新抗菌药物提供实验研究依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

为了检测抗菌肽ET12的抗菌活性,本实验共选择6种30株常见菌,其中包括2种革兰阳性菌(金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌)和4种革兰阴性菌(鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希氏菌、肺炎克雷伯菌)。所有的标准菌株(ATCC25923、N315、ATCC12228、ATCC35984、ATCC27853、ATCC25922)均购自美国菌种保藏中心,其余临床菌株均为陆军军医大学第一附属医院临床分离所得。实验所用菌株信息见表1。

表1 抗菌肽ET12对不同细菌的MIC结果

菌株名	菌株号	ET12 MIC/μg·mL^{-1}
金黄色葡萄球菌	ATCC25923	64
	N315	32
	S26	32
	S28	64
	S29	8
表皮葡萄球菌	ATCC12228	8
	ATCC35984	16
	48	16
	49	16
	50	8
鲍曼不动杆菌	aba658	256
	aba659	32
	aba660	64
	aba661	128
	aba662	128
铜绿假单胞菌	ATCC27853	>256
	P544	>256
	P630	>256
	P669	>256
	P670	>256
大肠埃希氏菌	ATCC25922	>256
	E260	>256
	E270	>256
	E282	256
	E388	256
肺炎克雷伯菌	1206	>256
	1220	>256
	1240	>256
	1248	>256
	1314	>256

1.2 材料、试剂与仪器

小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(RAW264.7)购自中国科学院上海细胞生物研究所。试剂:DMEM细胞培养基(HyClone,SH30243.01);胎牛血清(HyClone,SV30087.03);哥伦比亚血琼脂平板(庞通医疗,PB1101);M-H肉汤(北京路桥,CM901);TSB培养基(索莱宝,LA0110);异硫氰酸荧光标记的伴刀豆球蛋白A(FITC-ConA;Sigma,C7642);碘化丙啶(PI;Simga,P4170);脱纤维绵羊血(索莱宝,TX0030);增强型CCK-8试剂盒(碧云天,C0017);Triton X-100(碧云天,ST795);二甲亚砜(DMSO;碧云天,ST038);戊二醛溶液(阿拉丁,G105907)。仪器:玻底培养皿(NEST,801002);3111型CO_2培养箱(美国Thermo公司);Muhiskan Spectrum型酶标仪(美国Thermo公司);

MAXQ 481R 型摇床(美国 Thermo 公司);JEM-1400 型透射电子显微镜(日本电子株式会社);LSM 780 型激光共聚焦显微镜(德国 ZEISS 公司)。

1.3 抗菌肽 ET12 的合成

抗菌肽 ET12 含有 12 个氨基酸残基,序列为苯丙氨酸-赖氨酸-赖氨酸-缬氨酸-异亮氨酸-缬氨酸-异亮氨酸-精氨酸-精氨酸-色氨酸-苯丙氨酸-异亮氨酸。通过芴甲氧羰基(Fmoc)固相化学方法合成多肽 ET12(批号:P15064-2-20171220),利用高效液相色谱法进行纯化,并进行质谱鉴定。用自动氨基酸测序仪测定氨基酸序列结构。上述均由上海生工生物工程股份有限公司完成。

1.4 最低抑菌浓度(MIC)测定

采用微量肉汤稀释法检测抗菌肽 ET12 对革兰阴性菌和革兰阳性菌的 MIC。各菌株分别接种至哥伦比亚血琼脂平板上,37 ℃培养 20 h 后,取单菌落,并用生理盐水稀释至 0.5 个麦氏比浊单位,用 M-H 肉汤进一步稀释 1 000 倍备用。少量 DMSO 溶解抗菌肽 ET12,按倍比稀释法用 M-H 肉汤将其稀释成 512~1 μg/mL 的浓度梯度。取 100 μL 各浓度的抗菌肽 ET12 溶液分别与 100 μL 稀释菌液一起加入 96 孔板中;取 100 μL 稀释菌液和 100 μL M-H 肉汤作为生长对照孔。37 ℃培养 20 h 后,读取 MIC 结果。

1.5 抗菌肽 ET12 对细菌生物膜形成的影响

用 TSB 培养基将过夜培养的表皮葡萄球菌比浊稀释至 1.0×10^8 CFU/L;无菌 6 孔板中放入无菌盖玻片,加入 2.5 mL 菌液和 2.5 mL 的抗菌肽 ET12 溶液,使得抗菌肽 ET12 的最终浓度为 1/4 MIC,以 TSB 培养基为阴性对照。37 ℃培养 24 h。取出盖玻片,用 PBS 溶液轻柔冲洗,去除未粘附细菌,并用吸水纸吸去多余水分,加入 2.5%的戊二醛溶液,固定 1.5 h。PBS 溶液冲洗后,加入 50 mg/mL 的 FITC-ConA 溶液,4 ℃避光染色 30 min。PBS 溶液冲洗后,加入 5 mg/L 的 PI 溶液,4 ℃避光染色 15 min。PBS 再次清洗后,晾半干,50%甘油封片。激光共聚焦显微镜定性观察标记为绿色荧光的多糖和标记为红色荧光的细菌细胞核。

1.6 抗菌肽 ET12 对细菌形态的影响

参照文献[8]描述的方法利用透射电子显微镜观察细菌形态。取对数生长期的表皮葡萄球菌与 MIC 浓度的 ET12,37 ℃、180 r/min 摇床培养 30 min。菌液与 PBS 共培养作为空白对照。1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,无菌生理盐水洗涤 3 次后,用 2.5%戊二醛固定 2 h 后,送至电镜室进行样品固定、脱水、包埋、切片和染色,最后用透射电子显微镜观察。

1.7 抗菌肽 ET12 对细菌细胞膜通透性的影响

通过 PI 染色观察 ET12 对细菌细胞膜通透性的影响[9]。取对数生长期的表皮葡萄球菌与 MIC 浓度的抗菌肽 ET12(PBS 作为空白对照)共培养 30 min 后,用 PBS 清洗细菌 3 次。100 μg/mL 的 PI 溶液染色 15 min 后,加入玻底培养皿中。激光共聚焦显微镜定性观察标记为红色荧光的膜破细菌。

1.8 抗菌肽 ET12 体外溶血性的测定

取脱纤维绵羊血 1 000 r/min 离心 10 min。弃上清,用 PBS 反复多次洗涤红细胞,直至上清透亮。用 10 倍体积的 PBS 重悬红细胞,制备红细胞悬液。用 PBS 按照倍比稀释法将抗菌肽 ET12 稀释为 5 120、2 560、1 280、640、320、160、80、40 μg/mL 的浓度,分别取 10 μL 肽液加入 96 孔板中,作为实验组,另取 10 μL PBS 和 10%的 Triton X-100 分别作为阴性对照组和阳性对照组。每孔加入 1×10^5 个红细胞悬液,每组 5 个复孔。5% CO_2、37 ℃孵育 30 min,1 500 r/min 离心 10 min,取上清至新的 96 孔板中,于 450 nm 处测光密度值[D(450)],并计算溶血率。溶血率=[实验组 D(450)-阴性对照组 D(450)]/[阳性对照组 D(450)-阴性对照组 D(450)]×100%。

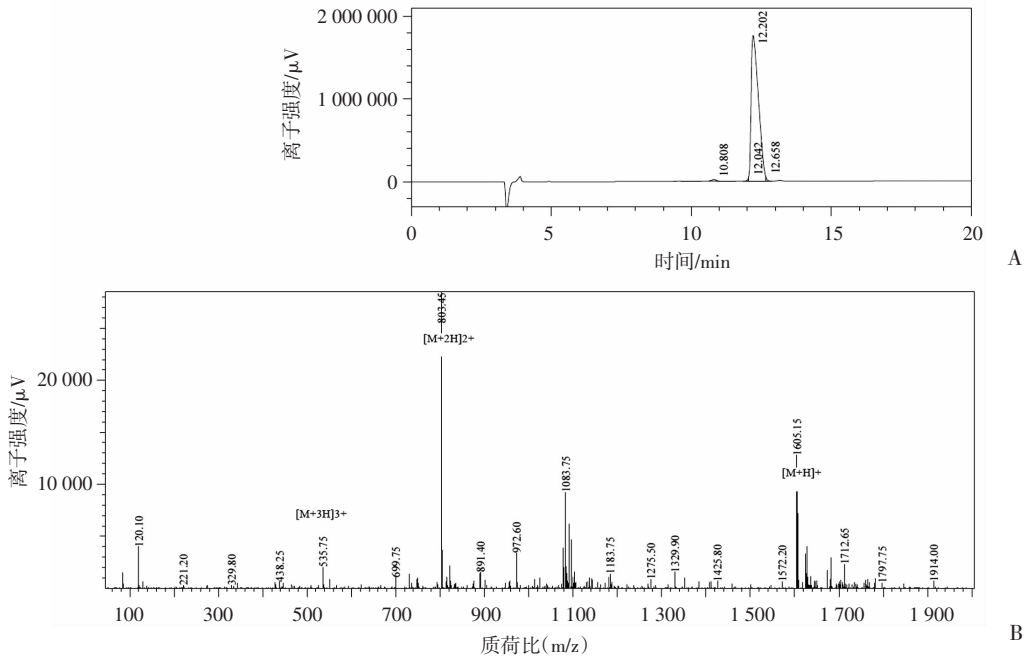
1.9 抗菌肽 ET12 细胞毒性测定

小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(RAW264.7)按照 1×10^5 个/孔接种至 96 孔板中,在含 5% CO_2 的恒温细胞培养箱中 37 ℃培养 24 h。弃上清,并用 PBS 清洗 2 次。用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基按照倍比稀释法将抗菌肽 ET12 稀释为 512、256、128、64、32、16、8、4 μg/mL,分别取 100 μL 加入清洗好的 96 孔板细胞中,作为实验组,并设置对照组(含有细胞和培养基)和空白组(只含有培养基),每组 3 个复孔。37 ℃、5% CO_2 条件下孵育 24 h。每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,细胞培养箱中孵育 30 min 后,在 450 nm 处测光密度值[D(450)],并计算细胞存活率。细胞存活率=[实验组 D(450)-空白组 D(450)]/[对照组 D(450)-空白组 D(450)]×100%。

2 结果

2.1 抗菌肽 ET12 的合成

ET12 是一种小分子多肽,由 12 个氨基酸残基组成,相对分子量为 1605.05,其中包括 4 个正电荷残基(精氨酸+赖氨酸)。高效液相色谱法鉴定其纯度为 98.0%(图 1A),质谱结果显示 ESI-MS(m/z):803.45 $[M+2H]^{2+}$、1605.15 $[M+H]^{+}$,ET12 的分子离子峰与合成预期结果一致(图 1B)。ET12 全序列为 FKKVIVIRRWFI,通过 NCBInr 蛋白质数据库检索,未发现有与之序列相匹配的蛋白质。



A:ET12 的高效液相色谱图;B:电喷雾电离(ESI)质谱图

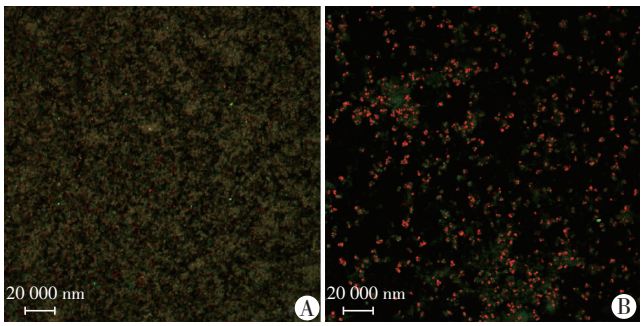
图 1 抗菌肽 ET12 的表征

2.2 MIC 测定结果

抗菌肽 ET12 对革兰阳性菌和革兰阴性菌的 MIC 结果如表 1 所示。抗菌肽 ET12 对革兰阴性菌几乎没有抗菌效果,MIC 值大部分均大于 256 μg/mL。相对而言,ET12 对革兰阳性菌的抗菌活性良好,其中对表皮葡萄球菌的抗菌活性最好,MIC 值均在 16 μg/mL 及以下。由于 ET12 对表皮葡萄球菌临床菌株 50 的抗菌活性最好,因此将其作为后续生物膜、细胞形态及细胞膜通透性实验的菌株。

2.3 抗菌肽 ET12 对细菌生物膜形成的影响

激光共聚焦显微镜观察亚-MIC ET12 对表皮葡萄球菌生物膜形成的影响,结果如图 2 所示。未经抗菌肽 ET12 处理的空白对照组,其表皮葡萄球菌密集,所形成的生物膜结构紧密。相对而言,1/4 MIC ET12 处理表皮葡萄球菌 24 h 后,细菌数量明显减少,细菌生物膜的形成疏散。

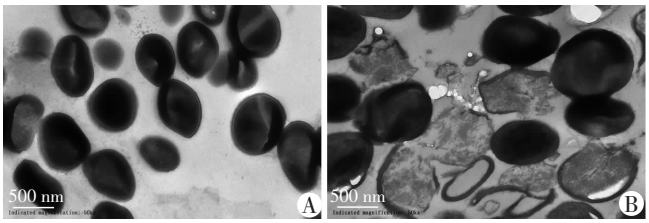


A:空白对照组;B:ET12 处理组

图 2 抗菌肽 ET12 对细菌生物膜形成的影响

2.4 抗菌肽 ET12 对细菌形态的影响

通过透射电镜观察 ET12 对表皮葡萄球菌细胞形态的影响,结果如图 3 所示。空白对照组表皮葡萄球菌细胞轮廓平滑完整,胞质密度均匀;而抗菌肽 ET12 处理组细胞溶胀破裂,细胞质向外渗漏。



A:空白对照组;B:ET12 处理组

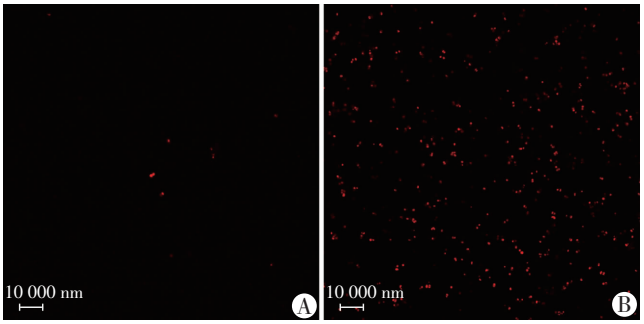
图 3 透射电镜观察抗菌肽 ET12 对细菌细胞形态的影响

2.5 抗菌肽 ET12 对细菌细胞膜通透性影响

激光共聚焦显微镜观察结果(图 4)显示,相比空白对照组,ET12 在 37 ℃与表皮葡萄球菌孵育 30 min 后,PI 穿透细胞膜,产生大量对照组极少存在的红色荧光。

2.6 抗菌肽 ET12 的溶血率

利用脱纤维绵羊血红细胞测定 ET12 的溶血活性,结果如图 5 所示。抗菌肽 ET12 的溶血率随浓度的升高而升高。虽然在 512 μg/mL 时对红细胞的溶血率为 6.85%,但在 8~64 μg/mL 时其溶血率在 0.62%~2.29%范围内,溶血活性较低。



A:空白对照组;B:ET12 处理组

图 4 菌肽 ET12 对细菌细胞膜通透性的影响

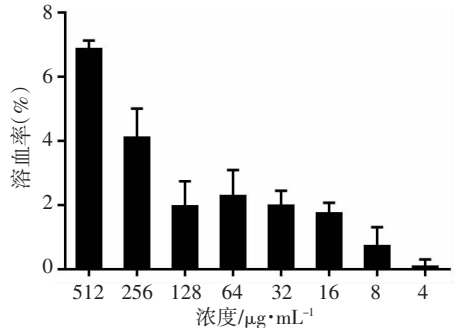


图 5 抗菌肽 ET12 对脱纤维绵羊红细胞的溶血率

2.7 抗菌肽 ET12 的细胞毒性

抗菌肽 ET12 的细胞毒性如图 6 所示。随着抗菌肽 ET12 浓度的增加,RAW264.7 细胞的存活率呈下降趋势。在 512 μg/mL 的浓度下,细胞存活率最低,为 47.82%。在抗菌肽 ET12 对革兰阳性菌的 MIC 范围内(MIC≤64 μg/mL),RAW264.7 细胞的存活率都大于 80%。结果表明,抗菌肽 ET12 的细胞毒性较小。

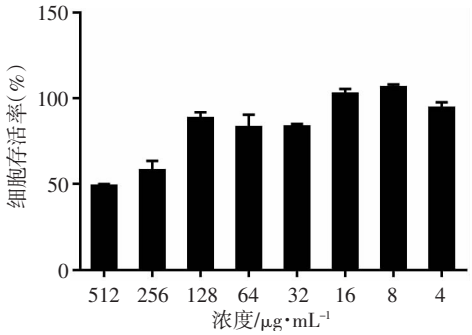


图 6 不同浓度抗菌肽 ET12 处理后 RAW264.7 细胞的存活率

3 讨论

由于抗菌药物的大量及不合理使用,多重耐药菌不断增加,给临床治疗带来了巨大挑战。目前抗菌药物的研发速度远低于耐药菌的出现,因此寻找新的抗菌药物成为亟待解决的问题。近年来,越来越多的人工抗菌肽被设计合成并发现具有广谱的抗菌活性[10-12]。本研究设计合成了一种抗菌肽 ET12,通过 MIC 测定发现其对革兰阳性菌,特别是表皮葡萄球菌具有较强的抗菌效果。ET12 对表皮葡萄球菌的 MIC 均≤16 μg/mL,与临床常用抗菌药物的 MIC 值相当。抗菌肽 ET12 由 12 个氨基酸残基组成,含有 4 个正电荷氨基酸和 66.67%的疏水氨基酸,是一种分子量小的阳离子疏水肽。抗菌肽 ET12 较好的抗革兰阳性菌活性效果可能是由于革兰阳性菌细胞壁表面存在的大量磷壁酸和糖醛酸磷壁酸使其对带正电的抗菌肽 ET12 更加敏感[1,13]。然而,ET12 对革兰阴性菌几乎没有抗菌活性。导致这种差异的原因可能是由于革兰阴性菌细胞壁外具有额外的一层外膜,比革兰阳性菌更能抵抗外来抗菌药物的入侵[14]。本研究中 ET12 对表皮葡萄球菌具有最强的抗菌活性,因此以表皮葡萄球菌为研究对象进行后续的生物膜、细菌形态及细胞膜通透性实验。

临床上 80%的感染都与生物膜相关。表皮葡萄球菌是生物膜相关感染的重要病原菌之一。表皮葡萄球菌能够粘附到外科植入材料上形成生物膜,生物膜中的细菌能够抵抗抗菌药物和宿主免疫系统的攻击,比浮游菌的耐药性高 1 000 倍[15]。本研究通过激光共聚焦显微镜观察生物膜,结果显示亚-MIC ET12 能够有效抑制表皮葡萄球菌的生物膜形成,提示抗菌肽 ET12 可能作为一种预防生物膜相关感染的治疗药物。

为了探讨 ET12 的抗菌作用机制,我们首先通过透射电镜观察表皮葡萄球菌细胞形态变化,结果显示 ET12 会导致表皮葡萄球菌的细胞破裂,细胞质向外渗漏。由于 PI 只穿透受损的膜,将 DNA 染成红色,因此通过测定细菌对 PI 的摄取量研究 ET12 对细菌细胞膜的通透性。实验结果显示 ET12 会造成表皮葡萄球菌细胞膜破裂,通透性增加。据此我们推测,阳离子抗菌肽 ET12 可能在穿过细胞壁后,通过作用于细胞膜,造成细胞膜破裂而表现出抗菌活性[16-18]。然而具体的作用方式,仍需更加深入的研究。

溶血活性和细胞毒性是衡量抗菌肽安全性的重要评价指标。本研究中,抗菌肽 ET12 虽然在高浓度中具有一定的溶血活性和细胞毒性,但在≤128 μg/mL 浓度范围内溶血性和细胞毒性较低。研究结果表明抗菌肽 ET12 在保证对革兰阳性菌具有良好的抗菌活性和抗生物膜形成活性的同时,还具有溶血率低,对正常细胞无毒性的特征,有作为抗生素替代药物的潜力。

参考文献:

[1] MORAVEJ H, MORAVEJ Z, YAZDANPARAST M, *et al*. Antimicrobial peptides: features, action, and their resistance mechanisms in bacteria[J]. Microb Drug Resist, 2018, 24(6): 747-767. DOI:10.1089/mdr.2017.0392.

[2] 李冠楠, 夏雪娟, 隆耀航, 等. 抗菌肽的研究进展及其应用[J]. 动物营养学报, 2014, 26(1): 17-25. DOI: 10.3969/j.issn.1006-267x.2014.01.003.
LI G N, XIA X J, LONG Y H, *et al*. Research progress and application of antimicrobial peptides [J]. Chin J Animal Nutrit, 2014, 26(1): 17-25. DOI: 10.3969/j.issn.1006-267x.2014.01.003.

[3] KOCZULLA A R, BALS R. Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential[J]. Drugs, 2003, 63(4): 389-406. DOI:10.2165/00003495-200363040-00005.

[4] NGUYEN L T, HANEY E F, VOGEL H J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action[J]. Trends Biotechnol, 2011, 29(9): 464-472. DOI:10.1016/j.tibtech.2011.05.001.

[5] BASTOS P, TRINDADE F, DA COSTA J, *et al*. Human antimicrobial peptides in bodily fluids: current knowledge and therapeutic perspectives in the postantibiotic era[J]. Med Res Rev, 2018, 38(1): 101-146. DOI:10.1002/med.21435.

[6] 彭博, 郭中敏, 陆家海. 人工合成抗菌肽的常用方法及应用前景[J]. 中国抗生素杂志, 2012, 37(3): 176-183. DOI:10.13461/j.cnki.cja.004954.
PENG B, GUO Z M, LU J H. The common methods and application prospect of the artificial synthetic antibacterial peptide[J]. Chin J Antibiot, 2012, 37(3): 176-183. DOI:10.13461/j.cnki.cja.004954.

[7] CHEN Z H, CHANG D, ZOU Y Q, *et al*. Genome sequence of Enterococcus faecium clinical isolate LCT-EF128[J]. J Bacteriol, 2012, 194(17): 4765. DOI:10.1128/JB.00996-12.

[8] OUYANG J, SUN F J, FENG W, *et al*. Antimicrobial activity of galangin and its effects on murein hydrolases of vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus (VISA) strain Mu50[J]. Chemotherapy, 2018, 63(1): 20-28. DOI:10.1159/000481658.

[9] WANG Q, XU Y Z, DONG M M, *et al*. HJH-1, a broad-spectrum antimicrobial activity and low cytotoxicity antimicrobial peptide[J]. Molecules, 2018, 23(8): E2026. DOI: 10.3390/molecules23082026.

[10] JIA F J, ZHANG Y, WANG J Y, *et al*. The effect of halogenation on the antimicrobial activity, antibiofilm activity, cytotoxicity and proteolytic stability of the antimicrobial peptide Jelleine-I[J]. Peptides, 2019, 112: 56-66. DOI:10.1016/j.peptides.2018.11.006.

[11] VOGEL H J, SCHIBLI D J, JING W G, *et al*. Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine-containing peptides[J]. Biochimie Et Biol Cell, 2002, 80(1): 49-63. DOI:10.1139/o01-213.

[12] 李国栋, 钱承军, 陆敏, 等. 一组人工合成抗菌肽的研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(3): 496-499. DOI:10.13343/j.cnki.wsxb.2006.03.033.
LI G D, QIAN C J, LU M, *et al*. A group of synthetic antimicrobial peptides[J]. Acta Microbiol Sin, 2006, 46(3): 496-499. DOI:10.13343/j.cnki.wsxb.2006.03.033.

[13] OMARDIEN S, BRUL S, ZAAT S A J. Antimicrobial activity of cationic antimicrobial peptides against gram-positives: current progress made in understanding the mode of action and the response of bacteria [J]. Front Cell Dev Biol, 2016, 4:111. DOI: 10.3389/fcell.2016.00111.

[14] GRUENHEID S, LE MOUAL H. Resistance to antimicrobial peptides in Gram-negative bacteria[J]. FEMS Microbiol Lett, 2012, 330(2): 81-89. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02528.x.

[15] SUN F J, QU F, LING Y, *et al*. Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies [J]. Future Microbiol, 2013, 8(7): 877-886. DOI:10.2217/fmb.13.58.

[16] BOLINTINEANU D, HAZRATI E, DAVIS H T, *et al*. Antimicrobial mechanism of pore-forming protegrin peptides: 100 pores to kill E. coli[J]. Peptides, 2010, 31(1): 1-8. DOI:10.1016/j.peptides.2009.11.010.

[17] MATSUZAKI K, NAKAMURA A, MURASE O, *et al*. Modulation of Magainin 2-lipid bilayer interactions by peptide charge[J]. Biochemistry, 1997, 36(8): 2104-2111. DOI:10.1021/bi961870p.

[18] WANG K, DANG W, YAN J, *et al*. Membrane perturbation action mode and structure-activity relationships of protonectin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the neotropical social wasp agelaia pallipes pallipes[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(10): 4632-4639. DOI: 10.1128/AAC.02311-12.

(**收稿**:2020-03-26;**修回**:2020-05-09)
(编辑 张 维)