

# 二茂铁位置异构对偶联阳离子多肽自组装行为及其抗菌效果的影响

李奕捷<sup>1\*</sup>, 王婧雯<sup>2#</sup> (1. 上海交通大学药学院, 上海 201100; 2. 空军军医大学西京医院药剂科, 西安 710038)

中图分类号 R978.1+6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2023)18-2226-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.18.10



**摘要** 目的 设计二茂铁(Fc)偶联阳离子多肽(以下简称“多肽”)的2种同分异构多肽[Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK、C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK]以及对照多肽[C<sub>8</sub>-K(C<sub>8</sub>)FFHK],探究Fc位置异构对多肽自组装行为及其抗菌效果的影响。**方法** 采用标准固相合成法合成位置异构的多肽,采用反相高效液相色谱法进行纯化;采用紫外可见分光光度法检测紫外吸收光谱,Zeta电位分析仪测定Zeta电位以分析多肽的稳定性;采用圆二色光谱(CD)、傅里叶红外光谱(FTIR)、硫代黄素T(ThT)荧光光谱、透射电子显微镜(TEM)等进行二级结构表征;通过体外活性氧(ROS)生成效率实验、生长曲线法测定实验、平板法实验、细胞毒性实验和溶血性实验评价2种同分异构多肽在抗菌活性和生物相容性上的差异。**结果** 合成了3种纯度均高于95%的多肽。稳定性实验结果显示,室温下放置24、96 h时,Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK、C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK的紫外吸收图谱几乎没有改变,二者的Zeta电位分别减少了0.3、0.5 mV。二级结构表征结果显示,Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK、C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK分别自组装成扭曲纳米带和短纳米纤维结构,C<sub>8</sub>-K(C<sub>8</sub>)FFHK自组装成圆柱状纳米纤维结构;光学图谱结果显示,3种多肽的 $\beta$ -折叠、 $\alpha$ -螺旋等结构含量具有一定差异。体外ROS生成实验结果显示,Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK在pH 6.0时的ROS生成效率高于C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK。体外抗菌活性结果显示,对于耐甲氧西林金黄色葡萄球菌,2种同分异构多肽的最低抑菌浓度(MIC)值均为50  $\mu$ g/mL,远低于对照多肽的MIC值(400  $\mu$ g/mL);对于大肠杆菌,Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK的抗菌活性优于C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK。细胞毒性实验和溶血性实验均结果显示,2种同分异构多肽均具有较好的生物相容性。**结论** 通过偶联Fc,能够提高多肽的抗菌活性;调节Fc在多肽序列中的位置,可调控多肽的自组装行为和抗菌效果。

**关键词** 抗菌肽;自组装;同分异构;芬顿反应

## Effects of ferrocene position isomerization on the self-assembly behavior and antibacterial effect of coupled cationic peptides

LI Yijie<sup>1</sup>, WANG Jingwen<sup>2</sup> (1. School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201100, China; 2. Dept. of Pharmacy, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710038, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To design the two isomers of ferrocene (Fc)-coupled cationic peptides (hereinafter referred to as “peptides”) [Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK and C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK] and the control peptide [C<sub>8</sub>-K(C<sub>8</sub>)FFHK], and to explore the effects of Fc position isomerization on the self-assembly behavior and antibacterial effect of peptides. **METHODS** All isomerized peptides were prepared by standard solid-phase synthesis and purified by reversed-phase high-performance liquid chromatography. The stability of the peptide was analyzed by using UV spectrophotometry to detect UV absorption spectra, and Zeta potential analyzer to determine Zeta potential. The secondary structure was characterized by circular dichroism spectrum (CD), Fourier transform infrared spectrometer (FTIR), thioflavin T (ThT) fluorescence spectrum and transmission electron microscopy (TEM). The differences in antibacterial activity and biocompatibility of the 2 kinds of isomerized peptides were evaluated by *in vitro* reactive oxygen species (ROS) generation test, growth curve determination test, plate method, cytotoxicity assay and hemolysis test. **RESULTS** Three peptides with purity higher than 95% were synthesized. The stability test results showed that the UV absorption spectra of Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK and C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK remained almost unchanged when placed at room temperature for 24 and 96 hours, and their Zeta potential were decreased by 0.3 mV and 0.5 mV, respectively. Secondary structure characterization results showed that Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK and C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK were self-assembled to form twisted nanoribbons and short nanofibers, respectively; C<sub>8</sub>-K(C<sub>8</sub>)FFHK was assembled into cylindrical nanofibers. The optical spectrum results showed that there were certain differences in the content of structures such as  $\beta$ -sheet and  $\alpha$ -helix. The *in vitro* ROS generation test results showed that ROS generation efficiency of Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK at pH 6.0 was higher than C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK. The results of *in vitro* antibacterial activity showed that for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, both the isomeric peptides had similar minimum inhibitory concentration (MIC) values of 50  $\mu$ g/mL which were far lower than the control peptide (400  $\mu$ g/mL). To *Escherichia coli*, Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK had better antibacterial activity than C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK. Finally, cytotoxicity assay and hemolysis test results showed that both isomeric peptides had good biocompatibility. **CONCLUSIONS** By coupling Fc, the antibacterial activity of cationic self-

\* 第一作者 硕士研究生。研究方向:自组装多肽的设计。E-mail:936640537@qq.com

# 通信作者 主任药师,硕士。研究方向:临床药物研究。E-mail:wangjingwen8021@163.com

antibacterial activity than C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK. Finally, cytotoxicity assay and hemolysis test results showed that both isomeric peptides had good biocompatibility. **CONCLUSIONS** By coupling Fc, the antibacterial activity of cationic self-

assembled peptides can be improved. Regulating the position of Fc in the peptide sequence could regulate the self-assembly behavior and antibacterial effect of the self-assembled peptides.

**KEYWORDS** antibacterial peptides; self-assembly; isomerism; Fenton reaction

细菌感染是威胁人类健康的重要卫生问题之一, 抗生素的出现和应用为治疗细菌感染做出了巨大贡献<sup>[1]</sup>。然而, 近年来抗生素滥用导致了多种细菌耐药现象加剧, 抗生素的抗菌能力变得越来越有限<sup>[2]</sup>。天然抗菌肽是一种应用前景广泛的抗菌剂<sup>[3]</sup>, 通常带有正电荷, 可被吸附到细菌细胞膜的表面, 通过“桶板”模型、“地毯”模型等方式来损伤细胞膜, 以杀死细菌, 很少引起细菌耐药<sup>[4]</sup>, 且在此基础上衍生设计的自组装阳离子多肽相较于天然抗菌肽, 具有便于合成、设计简单、容易修饰、结构可调的优点<sup>[5-7]</sup>。但对于阳离子抗菌肽, 单一的抗菌机制往往要求较高的表面电位, 这可能会引起一定的细胞毒性和溶血性, 因此, 引入其他抗菌机制设计协同抗菌纳米材料成为了近年来研究的热点<sup>[8]</sup>。

芬顿反应产生的活性氧(reactive oxygen species, ROS)可协同抗菌<sup>[9]</sup>。ROS引起的氧化应激会损害核酸骨架, 同时还可通过诱导细胞死亡信号通路的激活来进行细胞内杀菌, 细菌感染引起的微酸性环境能够明显促进芬顿反应的发生, 从而实现对细菌的特异性损伤<sup>[10]</sup>。因此, 如何有效地与芬顿反应偶联以达到更好的协同抗菌效果是学者们研究的重点。研究表明, 具有相同氨基酸组成但顺序或者空间位置不同的肽序列对纳米结构的最终自组装具有显著影响, 如Ma等<sup>[11]</sup>合成了2种异构肽Ac-RFSFSFR-NH<sub>2</sub>和Ac-SFRFRFS-NH<sub>2</sub>, 二者含有相同的丝氨酸、精氨酸和苯丙氨酸残基, 但顺序不同, 二者分别组装形成了 $\beta$ -折叠结构和无规球状结构, 结构的不同可影响其表面电位和抗菌效果。本研究采用标准固相合成法合成一组同分异构的二茂铁(Ferrocene, Fc)偶联自组装多肽, 从其二级结构表征、ROS生成效率、抗菌活性以及生物相容性等方面, 探究调节官能团位置异构对多肽自组装行为和生物活性的影响, 以期为进一步开发新型协同抗菌纳米材料提供思路和策略。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有LC-20AR型半制备型液相色谱仪(日本Shimadzu公司), 6230型液相色谱-飞行时间质谱联用(TOF-MS)仪(美国Agilent公司), UV-2700型紫外可见分光光度计、NICOLET iS5型傅里叶红外光谱(Fourier transform infrared spectrum, FTIR)仪、Varioskan Flash-602型多功能酶标仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司], FL-6500型荧光光谱仪[珀金埃尔默仪器(上海)有限公司], Zetasizer Nano ZS型纳米粒度仪及Zeta电位分析仪(英国Malvern公司), J-1500型圆二色光谱(circular dichroism spectrum, CD)仪[佳科科(上海)贸易

有限公司], Tecnai G2型生物型透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)(美国FEI公司), BX53-611型研究级正置荧光显微镜(日本Olympus公司)等。

### 1.2 主要药品与试剂

Rink-酰胺树脂、赖氨酸[Fmoc-Lys(Mtt)-OH, K]、赖氨酸[Fmoc-Lys(Boc)-OH, K]、Fmoc-L-苯丙氨酸(F)、苯并三氮唑-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸盐、二甲基甲酰胺(DMF)均购自吉尔生化(上海)有限公司, 批号分别为GLS211122-49101、GLS20080-3-36813、GLS220802-36802、GLS200919-35701、GLS201005-00702、GLS21098-2210; *N*-Boc-*N'*-三苯甲基-L-组氨酸(H)、硫代黄素T(ThT)均购自上海毕得医药科技股份有限公司, 批号分别为BSA288、BNP774; Fc甲酸(批号C11558015)购自乐研试剂有限公司; 正辛酸(C<sub>8</sub>)、三异丙基硅烷、4-甲基-哌啶、30%过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)溶液、2,7-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)均购自上海泰坦科技股份有限公司, 批号分别为T912082、77927158、A52011、P2047146、P2033707; LB肉汤(批号1227K031)购自上海索莱宝生物科技有限公司; CCK-8试剂、杜氏改良Eagle培养基均购自上海碧云天生物技术有限公司, 批号分别为C0043、8122476。

### 1.3 菌株与细胞

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) ATCC 43300、大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 25922、人皮肤成纤维细胞(HFF-1)均购自上海雅吉生物科技有限公司, 批号分别为HDLR908、HBJT086、GEYI879。

## 2 方法

### 2.1 Fc偶联自组装多肽的制备、纯化及分子量测定

采用标准固相合成法<sup>[12]</sup>进行合成。用5 mL二氯甲烷和5 mL DMF膨胀Rink-酰胺树脂(0.5 mmol)30 min, DMF洗涤3遍后, 加入4-甲基-哌啶/DMF(1:4, *V/V*)溶液15 mL反应15 min, 再用DMF洗涤3遍, 重复上述操作; 然后加入树脂4倍量的氨基酸(或Fc、C<sub>8</sub>)/苯并三氮唑-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸盐/三异丙基硅烷(2:2:5, *m/m/m*)溶液, 加入DMF 8 mL, 反应至少2 h, 循环以上操作, 逐步延长设计的肽序列; 最后用8 mL DMF洗涤树脂3次, 用8 mL二氯甲烷洗涤树脂5次, 接着加入10 mL三氟乙酸/三异丙基硅烷/水(92.5:5:2.5, *V/V/V*)溶液, 反应3 h。通氮气将该溶液挥发至2~3 mL, 乙醚沉淀得到Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK、C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK、C<sub>8</sub>-K(C<sub>8</sub>)FFHK的粗产物。

采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法<sup>[13]</sup>对上述3种

粗产物进行纯化。以0.1%三氟乙酸溶液(A)-0.1%三氟乙酸乙腈溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~3 min, 5%B; 3~13 min, 5%B→30%B; 13~26 min, 30%B→60%B; 26~28 min, 60%B→95%B; 28~32 min, 95%B→5%B);流速为10 mL/min;柱温为25℃;进样量为5 mL;收集22~26 min的洗脱液。采用TOF-MS仪<sup>[14]</sup>测定多肽分子量。洗脱液于-65℃真空冷冻干燥后得到Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK、C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK、C<sub>8</sub>-K(C<sub>8</sub>)FFHK 3种多肽的冻干肽粉末。

## 2.2 Fc偶联自组装多肽的稳定性检测

取“2.1”项下3种多肽的冻干肽粉末,用磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)均匀溶解,得质量浓度均为10 mg/mL的单一溶液,室温下放置24 h待其自组装得到单一多肽储备溶液,然后用PBS(pH6.0)稀释得到质量浓度均为1 mg/mL的单一多肽溶液,分别于室温下放置24、96 h时,采用紫外可见分光光度计测定多肽溶液的紫外吸收光谱,Zeta电位分析仪测定其Zeta电位,以验证3种多肽的稳定性。

## 2.3 Fc偶联自组装多肽的二级结构表征

取“2.1”项下3种多肽的冻干肽粉末适量,按“2.2”项下方法进行自组装,然后用不同pH的PBS稀释,得到不同质量浓度的储备肽液,以进行实验研究。

### 2.3.1 CD的测定

在CD仪上记录3种多肽的CD图谱,具体方法如下:在恒定氮气流量下,将上述稀释后的储备肽液(500 μg/mL)放置在光通长度为0.1 cm的矩形石英室中,设置CD光谱范围为185~260 nm,狭缝宽度为0.1 nm。每组设3个平行,每个样品重复测量3次,取平均值。

### 2.3.2 FTIR的测定

将自组装24 h后的3种多肽进行冷冻干燥得到冻干肽粉末,并与KBr粉末共同碾磨至无明显颗粒后,压成片状,使用FTIR仪于1 500~1 700 cm<sup>-1</sup>范围内测量3种多肽的红外吸收情况。

### 2.3.3 ThT荧光光谱的测定

以ThT为荧光染料检测3种多肽中β-折叠的含量。将ThT(0.2 mg/mL)与“2.3”项下储备肽液(2 mg/mL)/PBS按1:1(V/V)混合,暗处放置2 h,采用荧光光谱仪进行检测,设置激发波长为450 nm,吸收波长为470~700 nm。每组设3个平行。

### 2.3.4 纳米形貌观察

采用生物型TEM进行观察。取5 μL稀释后的储备肽液(300 μg/mL),沉积在碳涂层铜网格上,用滤纸迅速吸取多余的溶液,然后在样品上方滴入2%乙酸铀酰水溶液负染色,再用滤纸吸取多余的溶液,将样品置于室温下晾干3 h,最后用生物型TEM(工作电压120 kV)对样品进行亮场透射电镜成像。

## 2.4 Fc偶联自组装多肽的体外ROS生成效率研究

### 2.4.1 溶液体系ROS生成效率的测定

采用亚甲基蓝(methylene blue, MB)褪色反应来表示ROS的生成效率。ROS的产生使得MB在664 nm波长处吸光度下降。将实验分为Control组、Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK组和C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK组,Control组加入H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(1 mg/mL, pH6.0)和MB溶液(10 mg/L, pH6.0),Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK组和C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK组均在Control组的基础上加入“2.2”项下多肽储备溶液的稀释液(0.1 mg/mL, pH6.0),将各组的水溶液分别等量混合,将混合后的溶液各取2 mL,置于37℃摇床,分别在20、40、60、120 min时,采用紫外可见分光光度计于664 nm波长处检测吸光度。

### 2.4.2 细胞内ROS生成效率的测定

采用DCFH-DA探针检测细胞内的ROS生成效率。将培养至对数生长期的*E. coli*菌株用不同pH(pH6.0、pH7.4)的PBS稀释,采用紫外可见分光光度计得到在600 nm波长处吸光度(简称“OD<sub>600</sub>”)值为0.15的菌液。将实验分为Control组(给予PBS)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组(给予PBS及100 μg/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK组[给予PBS及100 μg/mL Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK]、C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK组[给予PBS及100 μg/mL C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK]、Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组[给予PBS、100 μg/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>及100 μg/mL Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK]、C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组[给予PBS、100 μg/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>及100 μg/mL C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK],上述各组分别与2种pH(pH6.0、pH7.4)下培养的*E. coli*菌株共孵育,于37℃恒温箱中反应8 h;随后以2 500 r/min离心3 min去除PBS,用生理盐水洗涤菌株3遍;加入500 μL DCFH-DA生理盐水溶液(100 μg/mL)重悬*E. coli*菌株,于37℃下孵育30 min,再用生理盐水洗涤菌株3遍;最后用100 μL生理盐水重悬*E. coli*菌株,吸取3 μL滴加在盖玻片上,置于正置荧光显微镜下观察。

## 2.5 Fc偶联自组装多肽的抗菌活性评价

### 2.5.1 生长曲线法测定最低抑菌浓度

将培养至对数生长期的MRSA、*E. coli*菌株用PBS(pH6.0)稀释,得到OD<sub>600</sub>值为0.15的菌液。同时按“2.2”项下方法配制不同质量浓度(200~16 000 μg/mL)的多肽溶液,接种于96孔板中,每孔加入180 μL上述菌液及10 μL各质量浓度的多肽溶液、10 μL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(10 mg/mL),使得3种多肽的最终质量浓度为10~800 μg/mL;另取10 μL PBS按上述操作后作为对照,每组设3个平行。将96孔板置于37℃酶标仪中测量OD<sub>600</sub>值。细菌生长活力呈现浓度依赖性下降,当OD<sub>600</sub>值不再升高时的最低质量浓度被认为是最低抑菌浓度(MIC)<sup>[15]</sup>。

### 2.5.2 平板法评价抑菌能力

将培养至对数生长期的 MRSA、*E. coli* 菌株用 PBS (pH 6.0) 稀释, 得到 OD<sub>600</sub> 值为 0.15 的菌液。同时采用倍比稀释法配制不同质量浓度 (15~800 μg/mL) 的多肽溶液, 接种于 96 孔板中, 加入 180 μL 上述菌液及 10 μL 各质量浓度的多肽溶液、10 μL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mg/mL), 即得混合物; 另取 10 μL PBS 按上述操作后作为对照。各组于 37 °C 下反应 8 h, 随后在无菌条件下吸取 100 μL, 均匀地平铺在 LB 肉汤琼脂固体培养基上, 37 °C 下培养 18 h 后, 通过菌落的数量来评价多肽的抑菌能力。

## 2.6 Fc 偶联自组装多肽的生物相容性评价

### 2.6.1 细胞毒性检测

使用 CCK-8 法对 3 种多肽的细胞毒性进行评价。将 HFF-1 按 5×10<sup>3</sup> 个/孔接种在 96 孔板中, 在 37 °C、含 5%CO<sub>2</sub> 的恒温细胞培养箱中培养 18 h 至细胞贴壁, 随后将原始细胞培养基替换为添加有不同质量浓度的 3 种多肽溶液 (25、50、100、200 μg/mL) 的新鲜杜氏改良 Eagle 培养基, 其中只加入新鲜杜氏改良 Eagle 培养基的作为对照, 每组设 3 个平行。24 h 后将培养基替换为含有 10% CCK-8 的新鲜杜氏改良 Eagle 培养基, 孵育 2 h, 使用酶标仪于 450 nm 波长处检测各孔的吸收值, 并计算细胞活力: 细胞活力 (%) = (测量值 - 空白值) / (对照值 - 空白值) × 100%。

### 2.6.2 溶血性检测

将新鲜兔血样品 (0.5 mL) 与 PBS (1 mL, pH 7.4) 混合, 以 4 500 r/min 离心 5 min, 分离红细胞, 用 PBS 清洗 5 次后, 再用 PBS 稀释至 5 mL。取 0.3 mL, 加入 1.2 mL 3 种不同质量浓度的多肽溶液 (50、100、200 μg/mL), 涡旋混合均匀, 在室温下放置 3 h 后, 以 2 500 r/min 离心 3 min, 取上清液。使用酶标仪于 540 nm 波长处测量上清液的吸光度 (*A*); 以去离子水代替多肽溶液作为阳性对照, PBS 代替多肽溶液作为阴性对照, 并按下式计算溶血率: 溶血率 (%) = (*A*<sub>多肽</sub> - *A*<sub>PBS</sub>) / (*A*<sub>去离子水</sub> - *A*<sub>PBS</sub>) × 100%。

## 3 结果与分析

### 3.1 Fc 偶联自组装多肽的制备、纯化及分子量测定结果

本研究合成并纯化得到 2 种同分异构多肽 Fc-K (C<sub>8</sub>) FFHK、C<sub>8</sub>-K (Fc) FFHK 以及对照多肽 C<sub>8</sub>-K (C<sub>8</sub>) FFHK 3 种多肽分子 (图 1)。3 种多肽的纯度均大于 95% (图略); Fc-K (C<sub>8</sub>) FFHK 和 C<sub>8</sub>-K (Fc) FFHK 的

理论分子量均为 1 042.44, C<sub>8</sub>-K (C<sub>8</sub>) FFHK 的理论分子量为 956.12, 与 TOF-MS 结果相符 (图略)。

### 3.2 Fc 偶联自组装多肽的稳定性结果

Zeta 电位的变化能够验证分散体系的物理稳定性<sup>[16]</sup>。本研究结果显示, 室温下放置 24、96 h 时, Fc-K (C<sub>8</sub>) FFHK、C<sub>8</sub>-K (Fc) FFHK 的紫外吸收图谱几乎没有改变。放置 96 h 时与放置 24 h 时相比, Fc-K (C<sub>8</sub>) FFHK、C<sub>8</sub>-K (Fc) FFHK 的 Zeta 电位分别减少了 0.3、0.5 mV, 证明 2 种多肽的稳定性良好, 具有作为抗菌肽药物进行研究和应用的基本条件<sup>[17]</sup>。

### 3.3 Fc 偶联自组装多肽的二级结构表征结果

CD 图谱特征区可以表明多肽溶液中存在二级结构, 包括 β-折叠、α-螺旋、无规卷曲等<sup>[14]</sup>。CD 图谱结果显示, Fc-K (C<sub>8</sub>) FFHK 和 C<sub>8</sub>-K (Fc) FFHK 在 208 nm 波长处均有明显的负峰, 这表明 Fc-K (C<sub>8</sub>) FFHK 和 C<sub>8</sub>-K (Fc) FFHK 中存在 α-螺旋二级结构, 且二者在 225 nm 波长处的正峰归属于芳香性基团 Fc 的 π-π 共轭; C<sub>8</sub>-K (C<sub>8</sub>) FFHK 在 203、222 nm 附近波长处均有负峰, 这表明 C<sub>8</sub>-K (C<sub>8</sub>) FFHK 中同样存在 α-螺旋二级结构, 峰位置的微小偏移可能来自 Fc 或者 F 氨基酸提供的共轭结构。

FTIR 图谱能够通过酰胺 I 区和酰胺 II 区的特征峰形来表明蛋白或肽链二级结构的存在<sup>[18]</sup>。本研究结果显示, Fc-K (C<sub>8</sub>) FFHK、C<sub>8</sub>-K (Fc) FFHK 和 C<sub>8</sub>-K (C<sub>8</sub>) FFHK 均在 1 631 cm<sup>-1</sup> 处有明显的特征峰, 表明溶液中存在 β-折叠。ThT 荧光光谱结果显示, 在同一波长条件下, Fc-K (C<sub>8</sub>) FFHK 中 β-折叠含量最高。

纳米形貌观察结果显示 (图 2), Fc-K (C<sub>8</sub>) FFHK 自组装成带宽为 (11 ± 4) nm 的扭曲纳米带, C<sub>8</sub>-K (Fc) FFHK 组装成直径为 (9 ± 2) nm 的短纳米纤维, C<sub>8</sub>-K (C<sub>8</sub>) FFHK 则组装成直径为 (8 ± 2) nm 的圆柱状纳米纤维。

纳米结构的差异与多肽序列有关<sup>[19]</sup>。C<sub>8</sub>-K (C<sub>8</sub>) FFHK 是典型的叉指状结构, 叉指状结构通常以分级组装的方式进行自组装, 亲水性的氨基酸围绕疏水中心排布形成胶束, 再以分级组装的方式逐步自组装形成圆柱状纳米纤维。Fc-K (C<sub>8</sub>) FFHK 和 C<sub>8</sub>-K (Fc) FFHK 纳米形态的差异来自 Fc 残基和 C<sub>8</sub> 残基的相对位置差异: 当长烷基链处于多肽主链时, 多肽更倾向于聚集形成疏水中心, 以“聚集-成核-延长”的过程形成圆柱状纳米结构, 但是由于 Fc 的存在, 共轭结构之间的 π-π 电子堆叠作用阻碍了纳米纤维在纵向上的不断生长, 难以延长形成交联

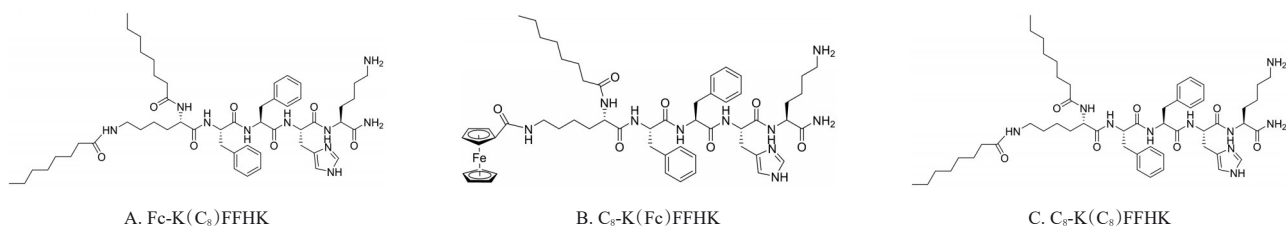
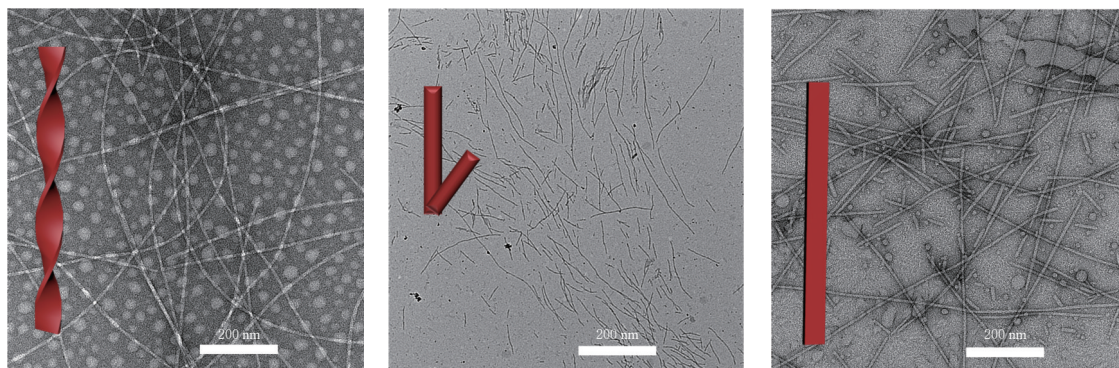


图 1 Fc-K (C<sub>8</sub>) FFHK、C<sub>8</sub>-K (Fc) FFHK 和 C<sub>8</sub>-K (C<sub>8</sub>) FFHK 的结构式



A. Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK

B. C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK

C. C<sub>8</sub>-K(C<sub>8</sub>)FFHK

图2 Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK、C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK和C<sub>8</sub>-K(C<sub>8</sub>)FFHK的TEM图

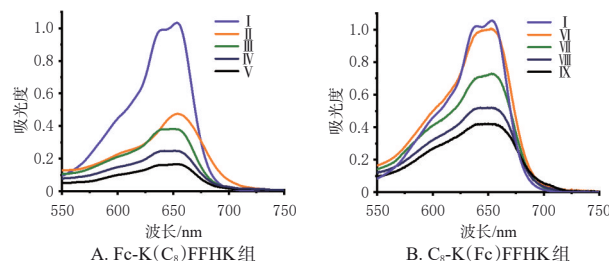
的纳米纤维,因而自组装形成长度较短的纳米纤维结构;当Fc残基处于多肽主链时,分子间氢键和芳香基团之间的 $\pi$ - $\pi$ 电子堆叠作用成为了分子纵向延长的主要驱动力,Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK最终形成了扭曲的纳米带结构<sup>[19]</sup>。

综上,Fc位置的改变可以调节多肽的自组装驱动力,如疏水相互作用、 $\pi$ - $\pi$ 电子堆叠作用等,进而调控多肽的自组装进程,而C<sub>8</sub>-K(C<sub>8</sub>)FFHK也进一步证明了N端官能团Fc对自组装的调控作用。

### 3.4 Fc偶联自组装多肽的体外ROS生成效率结果

MB褪色反应结果显示(图3),随着反应时间的延长,Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK组吸光度较Control组明显下降,而C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK组吸光度微弱下降;反应120 min时,Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK组吸光度为0.17,C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK组吸光度为0.36。

DCFH-DA本身没有荧光且可以自由穿过细胞膜,可在胞内水解生成DCFH,DCFH被ROS氧化成有荧光的DCF。因此,检测特定波长下的荧光强度可以反映细胞内的ROS水平。当pH为6.0时,与Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK共孵育的*E. coli*菌株绿色荧光强度最强,而与C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK共孵育的*E. coli*菌株荧光强度较弱,这表明Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK在微酸性环境下,ROS生成效率明显高于C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK;当pH为7.4时,二者共孵育的*E. coli*菌株均显示微弱的



A. Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK组

B. C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK组

I : Control组; II : Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK组(20 min); III : Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK组(40 min); IV : Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK组(60 min); V : Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK组(120 min); VI : C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK组(20 min); VII : C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK组(40 min); VIII : C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK组(60 min); IX : C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK组(120 min)。

图3 Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK、C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK的MB褪色反应紫外吸收光谱图

荧光强度(图4),这表明微酸性环境也是芬顿反应能够高效进行的重要因素之一<sup>[20]</sup>。

### 3.5 Fc偶联自组装多肽的抗菌活性结果

前文结果显示,Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK、C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK的结构和ROS生成效率有明显的差异。为进一步探究上述差异对抗菌效果的影响,本研究以OD<sub>600</sub>值来反映细菌相对数量以验证细菌的生长情况。MRSA生长曲线(图5)结果显示,Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK和C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK的MIC值均为50  $\mu$ g/mL,C<sub>8</sub>-K(C<sub>8</sub>)FFHK的MIC值则高达400  $\mu$ g/mL。对于*E. coli*菌株,Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK和C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK也显示出抗菌活性的差异,Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK

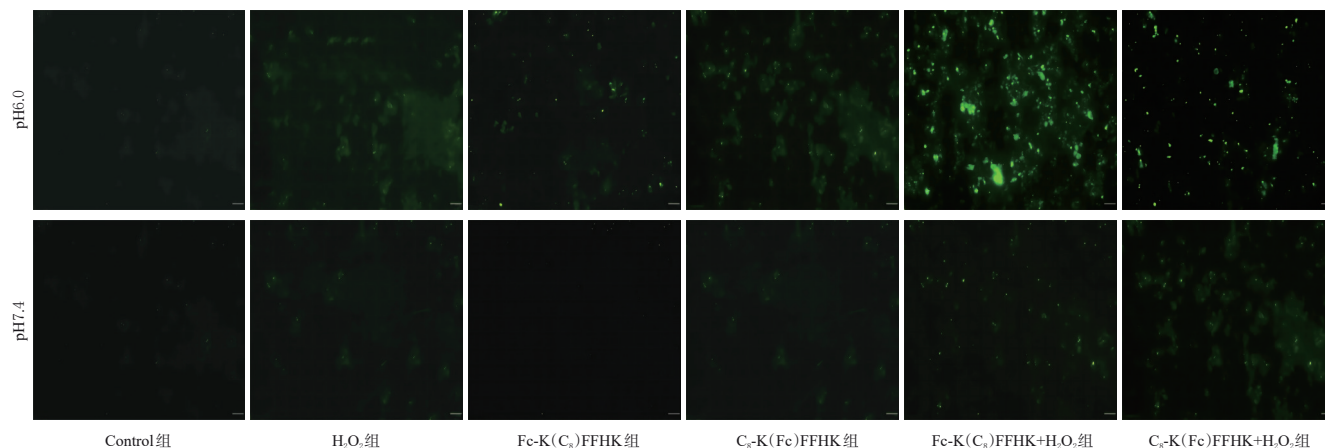


图4 不同处理方式下*E. coli*菌株细胞内ROS的生成荧光图( $\times 40$ )

的MIC值为100  $\mu\text{g/mL}$ ,  $\text{C}_8\text{-K}(\text{Fc})\text{FFHK}$  的MIC值为250  $\mu\text{g/mL}$ , 这与2种同分异构多肽的纳米形貌不同有关。革兰氏阴性菌细胞膜具有比革兰氏阳性菌更厚的脂质层, 而 $\text{Fc-K}(\text{C}_8)\text{FFHK}$ 具有交联和柔性的纳米结构, 其疏水残基能够灵活地进入细胞膜中, 这增加了芬顿反应在细胞内部发生的概率, 同时通过疏水基团与脂质双分子层更加紧密的相互作用, 进一步提高了自组装体以“桶板”模型的方式来物理损伤细胞膜的能力<sup>[21-22]</sup>。因此, 纳米形貌的不同可能影响了芬顿反应抗菌和物理损伤细胞膜两种机制的协同, 2种同分异构多肽展现出具有明显差异的抗*E. coli*能力。

平板菌落结果进一步佐证了3种多肽抑菌能力的差异。*MRSA*的平板菌落图(图6A)显示, 质量浓度为100  $\mu\text{g/mL}$ 时, 经 $\text{Fc-K}(\text{C}_8)\text{FFHK}$ 和 $\text{C}_8\text{-K}(\text{Fc})\text{FFHK}$ 处理后的琼脂平板中几乎无生长的菌落; 对于 $\text{C}_8\text{-K}(\text{C}_8)\text{FFHK}$ ,

当质量浓度为400  $\mu\text{g/mL}$ 时, 琼脂平板中仍然能够观察到零星的菌落, 表明存在Fc时, Fc诱导的芬顿反应能够显著地提高 $\text{Fc-K}(\text{C}_8)\text{FFHK}$ 和 $\text{C}_8\text{-K}(\text{Fc})\text{FFHK}$ 对*MRSA*的抑菌能力。此外,  $\text{Fc-K}(\text{C}_8)\text{FFHK}$ 和 $\text{C}_8\text{-K}(\text{Fc})\text{FFHK}$ 抑菌能力差异不明显, 这可能是因为 $\text{Fc-K}(\text{C}_8)\text{FFHK}$ 和 $\text{C}_8\text{-K}(\text{Fc})\text{FFHK}$ 介导的物理损伤细胞膜和芬顿反应抗菌机制在抗*MRSA*时均实现了良好的协同效应<sup>[23]</sup>。对于*E. coli*菌株,  $\text{Fc-K}(\text{C}_8)\text{FFHK}$ 的抑菌能力最佳,  $\text{C}_8\text{-K}(\text{Fc})\text{FFHK}$ 次之,  $\text{C}_8\text{-K}(\text{C}_8)\text{FFHK}$ 远低于前两者(图6B)。

3.6 Fc偶联自组装多肽的生物相容性结果

CCK-8结果显示, 质量浓度为200  $\mu\text{g/mL}$ 时, 经3种多肽处理后的HFF-1细胞活性均在70%以上, 这说明 $\text{Fc-K}(\text{C}_8)\text{FFHK}$ 在*E. coli*菌株的2倍MIC下仍有较好的生物相容性; 对于 $\text{C}_8\text{-K}(\text{Fc})\text{FFHK}$ , 当质量浓度达到*E. coli*菌株的2倍MIC值(500  $\mu\text{g/mL}$ )时, 会产生一定的

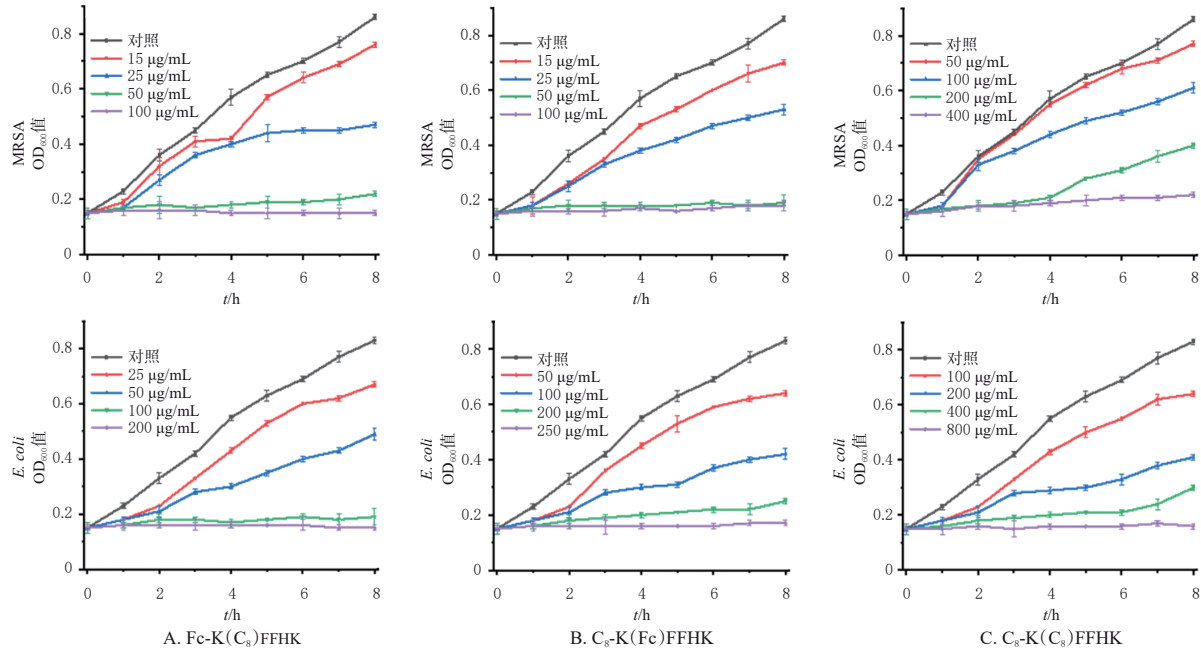


图5 不同质量浓度的3种多肽处理后MRSA和*E. coli*的生长曲线图

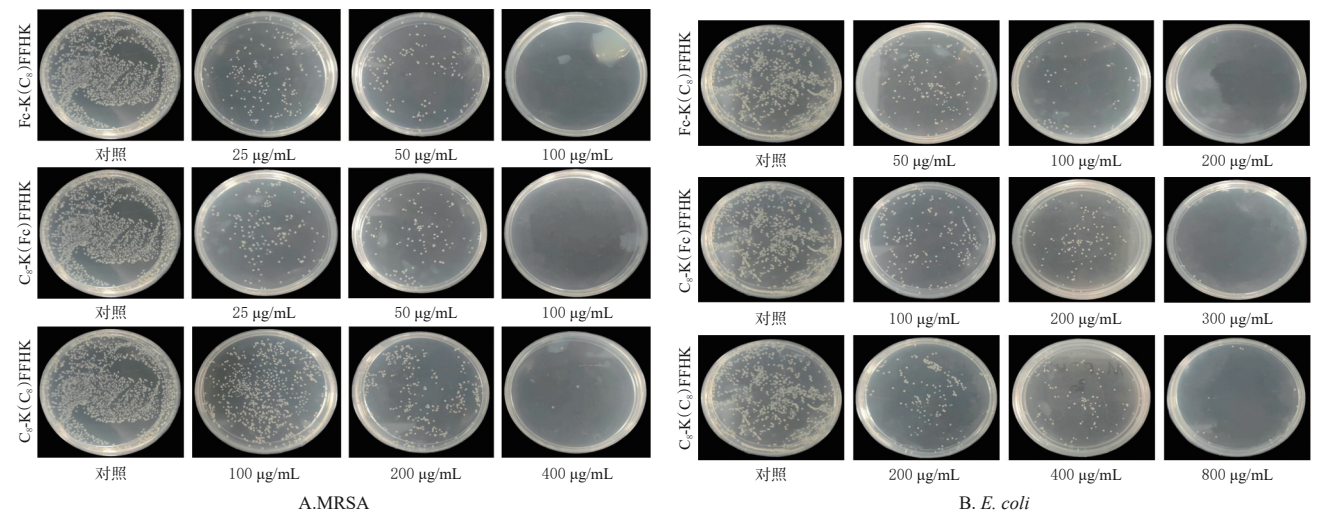


图6 不同质量浓度的3种多肽处理后MRSA和*E. coli*的平板菌落图

细胞毒性(细胞活性低于70%)。溶血性实验结果显示,3种多肽的溶血率均小于2%,这提示3种多肽不会产生严重的溶血现象。

#### 4 结语

同分异构的Fc-K(C<sub>8</sub>)FFHK和C<sub>8</sub>-K(Fc)FFHK自组装形成了不同的纳米结构,其Zeta电位具有一定差异。在生物活性方面,Fc的位置不同会显著地影响细胞内ROS生成效率和抗菌活性,但交联的扭曲纳米带结构能够提高自组装多肽的ROS生成效率及其进入细胞内部的概率,从而获得更强的抗菌活性,这为进一步设计功能化多肽材料以及协同抗菌纳米材料提供了合理的策略和有力的支撑。但是将研究环境转移到人体内时,自组装多肽结构和形貌以及体内药代动力学的变化还需深入研究,对于自组装多肽在细胞内的最终归宿和潜在的免疫原性也有待进一步探讨。

#### 参考文献

- [1] PIDDOCK L J V. Reflecting on the final report of the O'Neill review on antimicrobial resistance[J]. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16(7): 767-768.
- [2] DAVIES J, DAVIES D. Origins and evolution of antibiotic resistance[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2010, 74(3): 417-433.
- [3] LUO Y, SONG Y Z. Mechanism of antimicrobial peptides: antimicrobial, anti-inflammatory and antibiofilm activities[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21): 11401.
- [4] KARDANI K, BOLHASSANI A. Antimicrobial/anticancer peptides: bioactive molecules and therapeutic agents[J]. *Immunotherapy*, 2021, 13(8): 669-684.
- [5] MELO M N, FERRE R, CASTANHO M A R B. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(3): 245-250.
- [6] LI X S, BAI H T, YANG Y C, et al. Supramolecular antibacterial materials for combatting antibiotic resistance[J]. *Adv Mater*, 2019, 31(5): e1805092.
- [7] CRAIK D J, FAIRLIE D P, LIRAS S, et al. The future of peptide-based drugs[J]. *Chem Biol Drug Des*, 2013, 81(1): 136-147.
- [8] ZHANG X Y, ZHAO Y Q, ZHANG Y D, et al. Antimicrobial peptide-conjugated hierarchical antifouling polymer brushes for functionalized catheter surfaces[J]. *Biomacromolecules*, 2019, 20(11): 4171-4179.
- [9] KUANG F, CHEN Y J, SHAN W, et al. Biomimetic FeCo@PDA nanozyme platform with Fenton catalytic activity as efficient antibacterial agent[J]. *J Mater Chem B*, 2022, 10(29): 5582-5593.
- [10] 王迎军, 黄雪连, 陈军建, 等. 细菌感染微环境响应性高分子材料用于细菌感染性疾病的治疗[J]. *材料导报*, 2019, 33(1): 8-18.
- [11] MA Z Y, LIU X H, NIE J L, et al. Nano-antimicrobial

peptides based on constitutional isomerism-dictated self-assembly[J]. *Biomacromolecules*, 2022, 23(3): 1302-1313.

- [12] ZHAO Y R, WANG J Q, DENG L, et al. Tuning the self-assembly of short peptides via sequence variations[J]. *Langmuir*, 2013, 29(44): 13457-13464.
- [13] SAHOO J K, NAZARETH C, VANDENBERG M A, et al. Aromatic identity, electronic substitution, and sequence in amphiphilic tripeptide self-assembly[J]. *Soft Matter*, 2018, 14(45): 9168-9174.
- [14] LIANG C, BI X Y, GAN K S, et al. Short peptides derived from a block copolymer-like barnacle cement protein self-assembled into diverse supramolecular structures[J]. *Biomacromolecules*, 2022, 23(5): 2019-2030.
- [15] XIE Y Y, QIN X T, ZHANG J X, et al. Self-assembly of peptide nanofibers with chirality-encoded antimicrobial activity[J]. *J Colloid Interface Sci*, 2022, 622: 135-146.
- [16] DEMBEK M, BOCIAN S, BUSZEWSKI B. Solvent influence on Zeta potential of stationary phase-mobile phase interface[J]. *Molecules*, 2022, 27(3): 968.
- [17] FERREYRA MAILLARD A P V, ESPECHE J C, MATURANA P, et al. Zeta potential beyond materials science: applications to bacterial systems and to the development of novel antimicrobials[J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2021, 1863(6): 183597.
- [18] TAN A, XU F S, YOKOYAMA C, et al. Design, synthesis, and evaluation of the self-assembled antimicrobial peptides based on the ovalbumin-derived peptide TK913[J]. *J Pept Sci*, 2022, 28(4): e3375.
- [19] GONG Z Y, SHI Y Y, TAN H N, et al. Plasma amine oxidase-induced nanoparticle-to-nanofiber geometric transformation of an amphiphilic peptide for drug encapsulation and enhanced bactericidal activity[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12(4): 4323-4332.
- [20] SONG J L, LIU H, LEI M, et al. Redox-channeling polydopamine-ferrocene (PDA-fc) coating to confer context-dependent and photothermal antimicrobial activities[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12(7): 8915-8928.
- [21] ZHANG S, HOLMES T, LOCKSHIN C, et al. Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(8): 3334-3338.
- [22] ALBADA B, METZLER-NOLTE N. Highly potent antibacterial organometallic peptide conjugates[J]. *Acc Chem Res*, 2017, 50(10): 2510-2518.
- [23] CASTELLETTO V, EDWARDS-GAYLE C J C, HAMLEY I W, et al. Peptide-stabilized emulsions and gels from an arginine-rich surfactant-like peptide with antimicrobial activity[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(10): 9893-9903.

(收稿日期:2023-02-07 修回日期:2023-07-25)

(编辑:曾海蓉)