

抗菌肽 BLFcin6 与不同磷脂膜之间相互作用的分子动力学模拟研究*

孔真真^{1,4)} 赵立岭^{1,2)} 唐 艳^{1,3)} 王吉华^{1,2)} 曹赞霞^{1,2)**}

⁽¹⁾ 德州学院, 山东省生物物理省级重点实验室, 德州 253023; ⁽²⁾ 德州学院物理与电子信息学院, 德州 253023;

⁽³⁾ 德州学院资源环境与规划学院, 德州 253023; ⁽⁴⁾ 山东师范大学生命科学学院, 济南 250014)

摘要 抗菌肽具有广谱抗菌特性, 有望成为抗生素较好的替代产品. 研究抗菌肽的抗菌机制, 可以为新型抗菌肽的设计提供指导. 无论抗菌肽采用哪种抗菌机制, 其首先要稳定地吸附到细胞膜之上. 因此, 本文利用分子动力学模拟方法比较了抗菌小肽 BLFcin6 与 5 种不同细胞膜之间的相互作用. 对这 5 种细胞膜而言, 小肽会很快结合在 POPG 膜和 DPPC-CHOL 膜的表面, 倾向于进入 DPPC 膜的疏水内部, 与 POPC 膜和 POPC-CHOL 膜的接触很少. 考察相互作用能, 小肽与 POPG 膜的相互作用最强, 主要是小肽与细胞膜亲水头部存在静电相互作用; 小肽与 DPPC 膜的疏水尾部的相互作用较强, 但受胆固醇影响, 小肽只结合在 DPPC-CHOL 膜表面. 在结合过程中, 小肽 N 端的 Arg 会先结合到细胞膜上, 静电相互作用在小肽锚定细胞膜的过程中起关键作用. 以上研究从原子水平上解释了为什么 BLFcin6 小肽具有抗菌作用, 哪些残基起关键作用, 也为进一步开展 BLFcin6 小肽及其衍生小肽的研究奠定基础.

关键词 BLFcin6 抗菌小肽, 不同成分磷脂膜, 分子动力学模拟, 肽膜相互作用

学科分类号 Q615, Q7

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0256

抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)是存在于生物有机体多种多样的分泌物中的一种小分子多肽, 具有广谱抗菌活性^[1]. 动植物可以利用抗菌肽来抵抗各种微生物, 如细菌、真菌和病毒等. 另外, 抗菌肽还可以抑制肿瘤细胞的生长、中和内毒素等^[2]. 随着致病菌的耐药性不断增强, 寻找新型抗菌药物变得十分重要. 抗菌肽作为天然免疫的主要成分, 具有分子质量小、热稳定性高且不易产生抗药性的特点, 有望成为抗生素最好的替代产品^[3]. 抗菌肽抗菌机制研究能为新型抗菌肽的设计提供指导. 近年来, 抗菌肽的抗菌机制一直是研究的热点, 但目前尚未有一个理论能涵盖所有抗菌肽的作用机制. 与细胞膜作用相关的抗菌机制认为, 抗菌肽穿过细胞膜后与细胞内目标特异性结合, 或者在细胞膜上打孔导致细胞内容物外漏, 从而导致细胞死亡^[4-5]. 目前提出的抗菌肽与细胞膜作用机制的模型主要有“地毯式”(carpet model)^[6]、“环型孔式”(toroidal model pore)^[7]、“木桶式”

(barrel-stave pore)^[8]以及胶束模型^[9-10]等.

牛乳铁素(bovine lactoferricin, BLFcin)是一种衍生于牛乳铁蛋白(bovine lactoferrin, BLF)的抗菌肽, 其序列为 FKRRWQWRMKKLGAVRRAF. BLFcin 不仅能抑菌同时还能杀死多种癌细胞而不伤害正常健康的细胞^[11], 其抗菌活性的中心肽段是 RRWQWR, 称为 BLFcin6. 已有研究表明: 与 BLFcin 或者 BLF 相比, BLFcin6 表现出了相似且更强的抗菌活性, 但丧失抗癌细胞活性^[12-13]. 将 BLFcin6 的 N 端乙酰化和 C 端酰胺化能明显地增加对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的抗菌活性^[12], 但对白血病细胞 Jurkat 和乳腺癌细胞 MDA-MB-

* 国家自然科学基金(31670727, 61671107), 山东省自然科学基金(ZR2016CQ15, ZR2014AL014)和山东省科学发展计划(2014GNC110025)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0534-8985879, E-mail: qiyailai@mail.ustc.edu.cn

收稿日期: 2017-07-05, 接受日期: 2017-10-13

231 并没有细胞毒性^[13]. Huertas Méndez 等^[14]通过测量最低抑菌浓度和最低杀菌浓度,发现人工合成的二聚化 BLFcin6((RRWQWR)2K-Ahx)在测试的细菌种类中表现出了最高的抗菌活性,人工合成的单体肽(RRWQWR)、环化肽(-CRRWQWR-Ahx-C-)、四聚肽((RRWQWR)2K-Ahx)2等对 *E. coli* ATCC 11775 表现出了较高的抗菌活性. Richardson 等^[15]将 BLFcin6 与膜融合脂质体运送系统结合后,能够选择性地靶向恶性肿瘤细胞. 将 BLFcin6 通过 Gly-Gly 连接子连接到七聚精氨酸(R7)上,生成一种新的穿膜肽衍生物(称为 MPLfcinB6),该多肽对人类的 T-leukemia 细胞和 B-lymphoma 细胞具有选择性的细胞毒性,其可能的机制是带有正电荷的 R7 可以使 MPLfcinB6 结合到这两种肿瘤细胞膜的阴离子结构上, BLFcin6 中的疏水性色氨酸残基能够融入到脂质双分子层中,并且破坏细胞膜^[16]. 上述研究表明, BLFcin6 及其衍生物有作为新型抗癌药剂剂的潜能,但同时有关 BLFcin6 小肽及其衍生物的抗菌抗癌机制仍然存在很多问题有待于进一步深入探讨. 无论抗菌肽采用哪种作用机制,其能否或者如何稳定地吸附到细胞膜之上,是理解其抗菌行为的关键初始事件. 例如:对于不同组成成分的哺乳动物的细胞膜和细菌细胞膜,抗菌肽是否能与其发生相互作用;加入胆固醇是否会影响多肽与细胞膜之间的相互作用;哪些残基是影响相互作用的关键残基等.

分子动力学模拟^[17] (molecular dynamics simulation, MDs)已经成为探索微观世界生命现象的强有力工具. 基于分子动力学模拟研究抗菌肽与不同细胞膜之间的相互作用,是进一步理解其抗菌机制的一条重要途径. 吴建华等^[18]用 MD 方法模拟了 HP(2-20)与 POPE 膜的相互作用,结果表明:抗菌肽的 N 端首先与膜接触,并且维持一种倾斜的状态,还发现抗菌肽吸附到脂膜的过程是一个旋转落下的过程. Kyriakou 等^[19]用 MD 方法研究了由抗菌肽 PlnE 与 PlnF 组成的平行和反平行两种形式的二聚体与 3:1 的 POPG 膜:POPE 膜的相互作用,发现抗菌肽与细胞膜之间强的相互作用主要来源于带正电荷氨基酸残基(精氨酸 R 与赖氨酸 K)与细胞膜之间的盐键和氢键相互作用. Andersson 等^[20]基于 MD 方法研究抗菌肽 Melittin 与 DOPC 膜的相互作用,结果表明:Melittin 以折叠状态分布在膜界面,部分进入到了磷脂双分子层膜的头部基团. 分子动力学模拟能在原子水平上揭示抗菌肽与不同

细胞膜相互作用的特征,可以作为实验研究的有力补充.

本文采用分子动力学模拟方法比较 BLFcin6 小肽与 DPPC 膜、POPC 膜、POPG 膜以及加了胆固醇 (cholesterol) 的 DPPC-CHOL 膜 (DPPC : cholesterol = 3 : 2) 和 POPC-CHOL 膜 (POPC : cholesterol = 4 : 1) 之间的相互作用. 研究了抗菌肽 BLFcin6 在不同细胞膜中的位置及方向定位、与细胞膜作用的关键残基以及不同细胞膜作用的强弱等. 模拟结果发现, BLFcin6 与 POPG 膜的相互作用最强,结合最快,但并未进入到膜内; BLFcin6 更容易进入 DPPC 膜,到达了膜的羧基碳部位; BLFcin6 也接触了 POPC-CHOL 膜,并未进入到膜内;而小肽未与 POPC 膜接触.

1 方 法

1.1 分子动力学模拟

本文模拟共用 5 种不同细胞膜体系: DPPC 膜、POPC 膜、POPG 膜以及 3:2 的 DPPC-CHOL 膜和 4:1 的 POPC-CHOL 膜. 其中, DPPC、POPC 和 POPG 3 种磷脂膜分别含有 128 个脂分子(每层含有 64 个脂分子), DPPC-CHOL 膜含有 80 个 DPPC 脂分子和 54 个胆固醇分子, POPC-CHOL 膜含有 100 个 POPC 脂分子和 24 个胆固醇分子. DPPC 膜和 POPC 膜是从 D. Peter Tieleman website (<http://wcm.ucalgary.ca/tieleman/downloads>) 下载的, POPG 膜是从 lipidbook website (<http://lipidbook.bioch.ox.ac.uk/lipid/>) 下载的. 含有胆固醇的 DPPC-CHOL 膜和 POPC-CHOL 膜是从 <http://cmb.bio.uni-goettingen.de/cholmembranes.html#DMPC20> 网站下载的.

DPPC 膜(1, 2- 二棕榈酸甘油 -3- 磷脂酰胆碱)和 POPC 膜(1- 棕榈酰基 -2- 油酰基卵磷脂)都可以作为动物细胞模式膜,它们含有相同的 PC 头部. POPG 膜(1- 棕榈酰基 -2- 油酰基磷脂酰甘油)是常用的细菌模式膜,每一个 POPG 分子带一个单位的负电荷^[21], POPC 膜和 POPG 膜含有相同的 PO 尾部,都含有一个不饱和的碳碳双键. 胆固醇是构成细胞膜的重要组成成分,是众多固醇类中的一种,存在于活的有机体细胞膜中,在动物细胞中最常见^[22]. 鉴于上述两种动物细胞模式膜(DPPC 膜和 POPC 膜)都不含有胆固醇,因此我们又添加了 DPPC-CHOL 膜和 POPC-CHOL 膜,这两种包含胆固醇的细胞膜更接近于真实的动物细胞膜. 分子动

力学模拟使用 GROMACS 4.5.3 软件包^[23], 小肽采用 GROMOS 53A6 力场^[24], 细胞膜采用 Berger 力场^[25], 水分子采用 SPC 模型^[26]. 体系搭建好之后, 利用最速下降法和共轭梯度法对体系进行能量优化达到最佳状态. 为使体系适应模拟环境, 再对其进行恒温(NVT)系综^[27]平衡以及恒压(NPT)系综^[28]平衡. 在平衡过程, 温度耦合采用 V-rescale 方法^[29], 热耦合时间常数为 0.1 ps. 对于 DPPC 膜、DPPC-CHOL 膜来说, 温度逐渐上升至 323K, 因为 DPPC 膜的相转变温度为 315K^[30]; 而对于 POPC 膜、POPG 膜以及 POPC-CHOL 膜来说, 温度上升至 300K, 因为 POPC 膜和 POPG 膜的相转变温度分别为 271K^[31]和 269K^[32]. 最后对每组模拟体系进行 500 ns 的模拟, 模拟采用蛙跳算法(leapfrog algorithm)^[33], 积分步长设为 2 fs, 长程静电相互作用采用 PME^[34]算法处理, 短程邻居列表截断和短程库伦截断半径设定为 1.2 nm, 计算范德华作用的

截断半径为 1.2 nm. LINCS^[35]算法约束小肽和脂分子的键长.

1.2 小肽-细胞膜体系

BLFcin6 与 DPPC 膜、POPC 膜、POPG 膜、DPPC-CHOL 膜以及 POPC-CHOL 膜的模拟分别用体系 I、体系 II、体系 III、体系 IV、体系 V 表示, 每种小肽 - 细胞膜体系分别进行两组模拟(两组模拟的初始构象相同, 初始速度不同). 用 Discovery Studio^[36]搭建 BLFcin6 小肽的初始结构, 把 BLFcin6 小肽放置在磷脂双分子层膜的外侧约 1.5 nm, 采用长方体盒子, 体系 I ~ V 所用盒子大小依次为 6.4 nm×6.4 nm×10.0 nm、6.1 nm×6.1 nm×10.0 nm、6.6 nm×6.6 nm×10.0 nm、5.1 nm×5.1 nm×20.0 nm、5.6 nm×5.6 nm×20.0 nm. 每组模拟体系所包含的分子数、抗衡离子数及所加水的个数如表 1 所示. 每组体系的初始结构如图 1 所示.

Table 1 Five different sets of simulation systems

	Phospholipid/Number of phospholipids/ number of cholesterol	Temperature/K	Counter ions	Number of water molecules	Total number of atoms	Simulation times
System I	DPPC/128/0	323	(CL ⁻)-3	6 468	25 915	500 ns × 2
System II	POPC/128/0	300	(CL ⁻)-3	5 628	23 651	500 ns × 2
System III	POPG/128/0	300	(NA ⁺)-125	7 549	29 664	500 ns × 2
System IV	DPPC-CHOL/80/54	323	(CL ⁻)-3	11 774	41 017	500 ns × 2
System V	POPC-CHOL/100/24	300	(CL ⁻)-3	14 601	49 828	500 ns × 2

2 结果分析

2.1 肽/膜体系的构象以及肽/膜质心间距随时间变化

图 1 是小肽与不同磷脂膜的初始构象(左侧第 1 列)以及 500 ns 模拟之后的构象, 第一组模拟(中)和第二组模拟(右)所得到的结构图基本相同, 图中磷脂膜中的磷原子用灰色球体表示, BLFcin6 小肽用红色表示. 为了便于观察, 磷脂分子中的其他原子和水分子都未显示. 图 1 中, BLFcin6 小肽进入到了 DPPC 膜的羰基端; 而停留在 POPG 膜、DPPC-CHOL 膜和 POPC-CHOL 膜的表面, 并没有进入膜内; 对于 POPC 膜, 小肽只是在膜的外侧, 与细胞膜之间没有接触.

以上只是通过观察构象初步确定小肽在细胞膜中的位置. 为了定量分析小肽在细胞膜中的具体位置, 我们计算了小肽质心与磷脂膜质心之间的距离

随时间变化情况, 如图 2 所示. 图 2 纵坐标是 BLFcin6 与不同磷脂膜质心之间的距离(nm), 横坐标表示模拟时间(ns). 其中红色和黑色的线作为参考线, 分别表示磷脂双分子层中的上层磷原子和羰基碳到细胞膜质心的距离, 绿色和蓝色的线表示两组不同初始速度模拟中 BLFcin6 质心到细胞膜质心的距离. 图 2 表明: 对同一种细胞膜, 两组模拟的结果基本一致. 通过分析可以发现: a. 体系 I 中的 DPPC 上层膜磷原子到膜质心的距离约为 1.9 nm, 模拟时间 100 ns 左右小肽开始接触 DPPC 膜, 130 ns 左右小肽开始接触羰基碳原子, 随后小肽在细胞膜的磷原子和羰基碳原子之间上下波动. b. 体系 II 中 POPC 上层膜磷原子到膜质心的距离约为 2.0 nm, 小肽在 500 ns 模拟时间内一直在细胞膜的上方运动, 没有接触 POPC 膜. c. 体系 III 中 POPG 上层膜磷原子到膜质心的距离约为 1.7 nm,

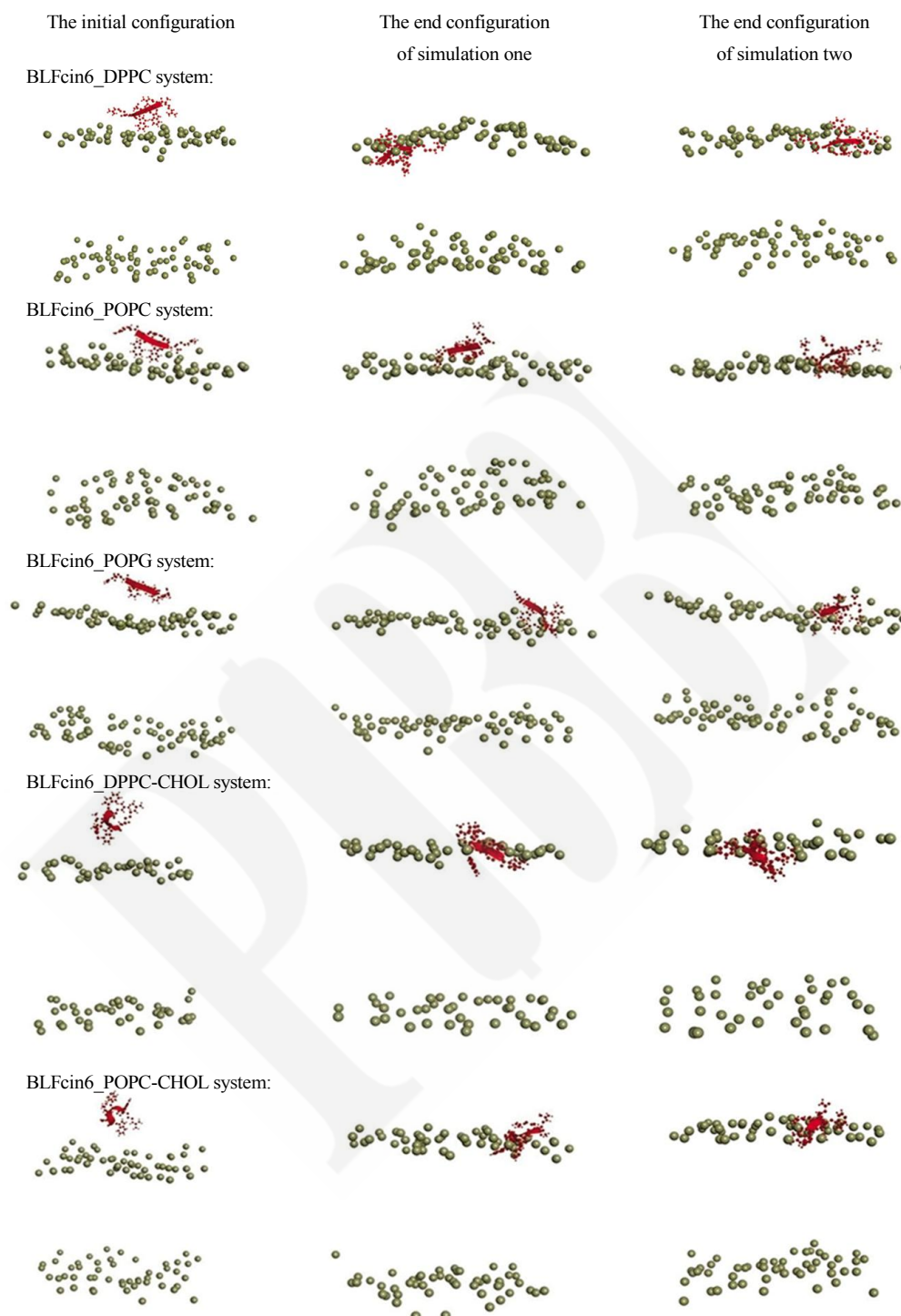


Fig. 1 The starting configuration of simulation (left panel) and the final configuration after 500 ns simulation (middle and right panel)

In the snapshot, the amino acid is shown in red ball. The lipid phosphate atoms are shown as grey spheres.

小肽约 20ns 左右就接触到膜表面，一直在膜表面运动。d. 体系Ⅳ中 DPPC-CHOL 上层膜磷原子到膜质心的距离为 2.3 nm，小肽大约 50 ns 左右接触膜表面，在膜表面上下波动，但是没有进入膜内。e. 体系Ⅴ中 POPC-CHOL 上层膜磷原子到膜质心

的距离约为 2.2 nm，小肽在 200 ns 时开始接触膜，200~450 ns 的时间内，小肽一直在膜表面上下波动，450 ns 以后，小肽逐渐远离上层膜。在 500 ns 模拟时间内，BLFcin6 小肽倾向于在 POPG 膜和 DPPC-CHOL 膜表面；小肽会进入到 DPPC 膜的羧

基端; 对于 POPC 膜和 POPC-CHOL 膜, 小肽与细胞膜之间的接触比较少. DPPC 膜与 DPPC-CHOL

膜相比, 胆固醇的加入会增加细胞膜的刚性, 使得 BLFcin6 小肽更难进入细胞膜内部.

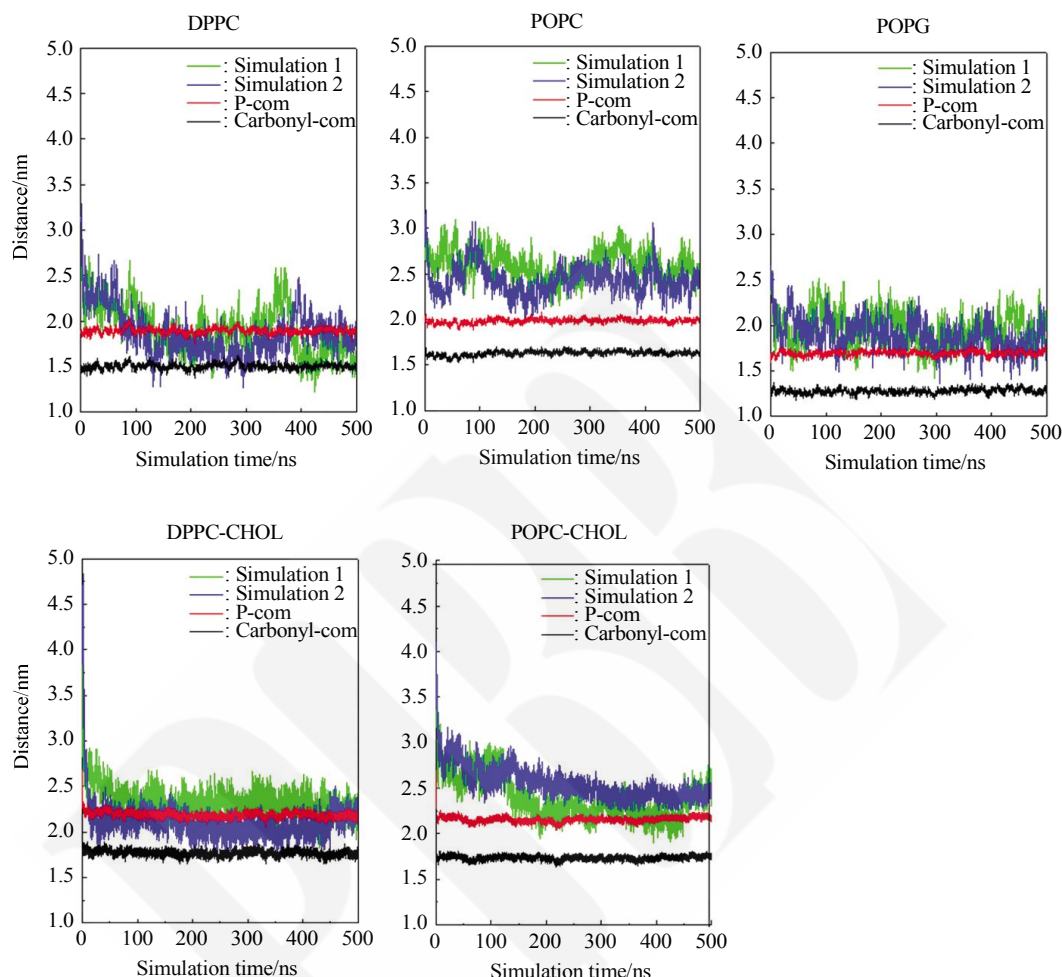


Fig. 2 The distance along the z axis between the center of peptide and the center of the lipid membrane in the 500 ns

The z-coordinate of the bilayer center is zero.

2.2 氨基酸残基与膜质心的距离随时间变化

2.2.1 小肽的氨基酸残基与细胞膜质心的距离随时间变化

接下来分析哪类残基先锚定到细胞膜上, 我们计算了小肽氨基酸残基到膜质心的距离随模拟时间变化情况, 如图 3 所示. 图中, 横坐标表示模拟时间(ns), 纵坐标表示氨基酸到膜质心的距离(nm). 其中红色和黑色的线分别表示磷脂双分子层中的磷原子和羰基碳到细胞膜质心的距离, 天蓝色、橘黄色、玫红色、绿色、蓝色以及灰色的线分别表示小肽从 N 端到 C 端的 6 个氨基酸残基(R1, R2, W3, Q4, W5, R6)到膜质心的距离. 从图 3 可以看出,

体系 I、体系 III 和体系 IV 中的 2 组模拟都是 N 端 Arg1 先接触到膜, 说明在这 3 组体系中 N 端的精氨酸首先与细胞膜产生相互作用, 不同的是体系 III 和体系 IV 比体系 I 结合稍快一些, 并且在随后的模拟中 N 端的 Arg1-Arg2 几乎都进入到了膜的羰基碳部位. 表明在小肽与膜的相互作用过程中, 精氨酸起着重要的作用. 在体系 II 的 2 组模拟中, 虽然 N 端的 Arg1 没有首先接触膜, 但在随后的模拟中 Arg1 也接触到膜且距膜最近. 体系 V 中 Gln4 先接触到膜上, 并且 Gln4、Trp3 及 Trp5 都进入到了膜的羰基碳部位, 说明了在体系 V 中小肽的中间部位首先与膜相互作用.

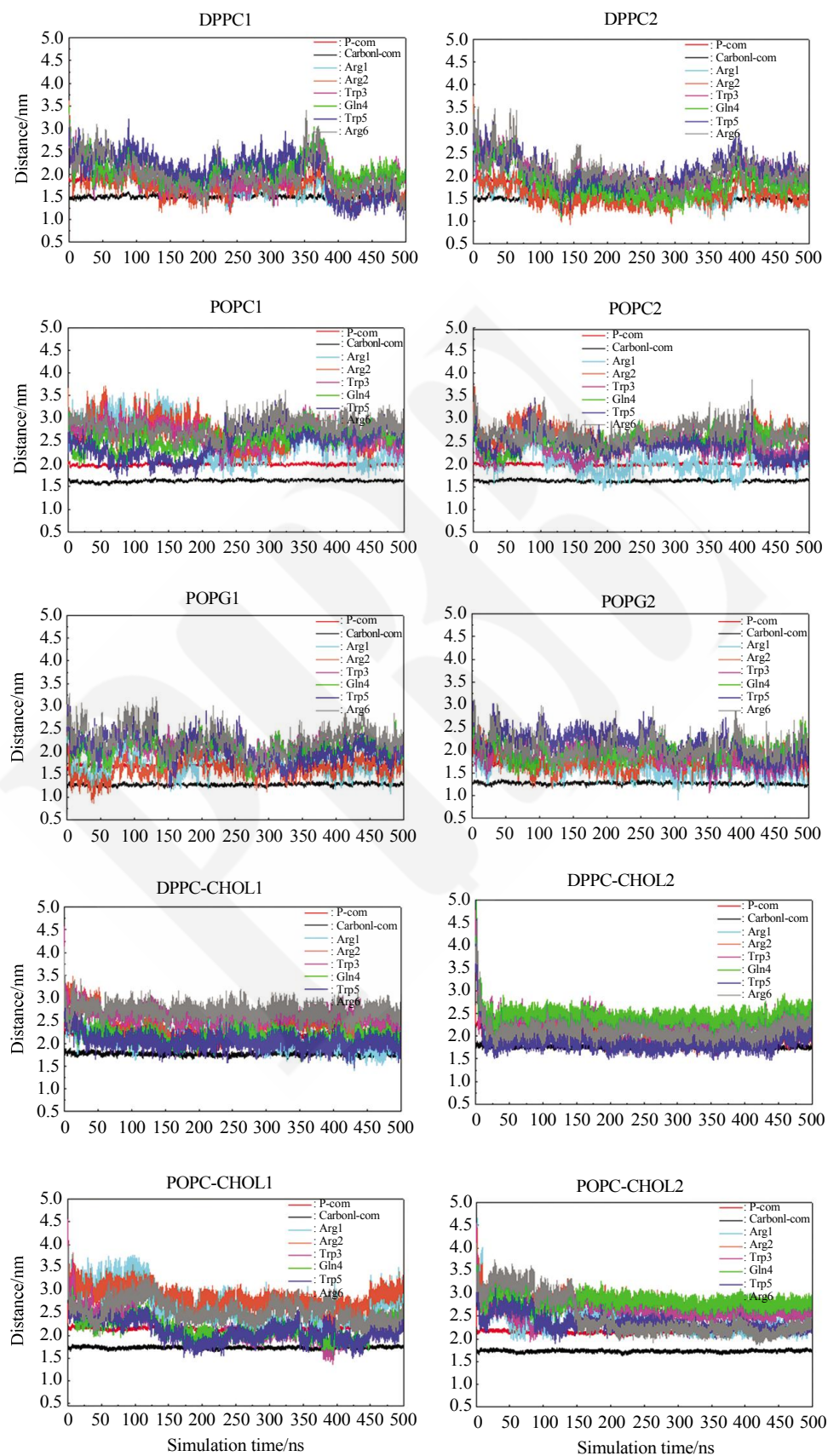


Fig. 3 The distance along the z axis between the center of each amino acid residues and the center of the lipid membrane in the 500 ns

2.2.2 小肽氨基酸残基与细胞膜质心的平均距离

图 4 计算了最后 200 ns 的模拟时间内 BLFcin6 不同的氨基酸残基与膜质心的平均距离。横坐标从左到右表示 BLFcin6 从 N 端到 C 端的氨基酸 RRWQWR, 纵坐标表示不同的氨基酸残基与细胞膜质心之间的平均距离。其中红色和黑色的线分别表示磷脂双分子层中的上层磷原子和羧基碳到膜质心的平均距离, 绿色带方形线和蓝色带圆形线分别代表两组模拟 BLFcin6 不同氨基酸到膜质心的平均距离。从图中可以看出小肽 N 端的 Arg1 进入到了

DPPC 膜、POPG 膜、DPPC-CHOL 膜内部, 说明在体系 I、III、IV 中, 小肽 N 端跟细胞膜先发生相互作用。体系 V 中小肽的 Trp3、Gln4、Trp5 都进入了膜内, 意味着小肽的中间部位与 POPC-CHOL 膜的相互作用比两端强。体系 II 中小肽虽然没有和膜接触, 但 N 端距离膜较近。小肽的 Trp5 进入了 DPPC 膜、DPPC-CHOL 膜和 POPC-CHOL 膜内部, 虽然并未进入 POPC 膜和 POPG 膜内, 但距离膜质心也较近, 说明了色氨酸在肽-膜的相互作用过程中也起着重要的作用。

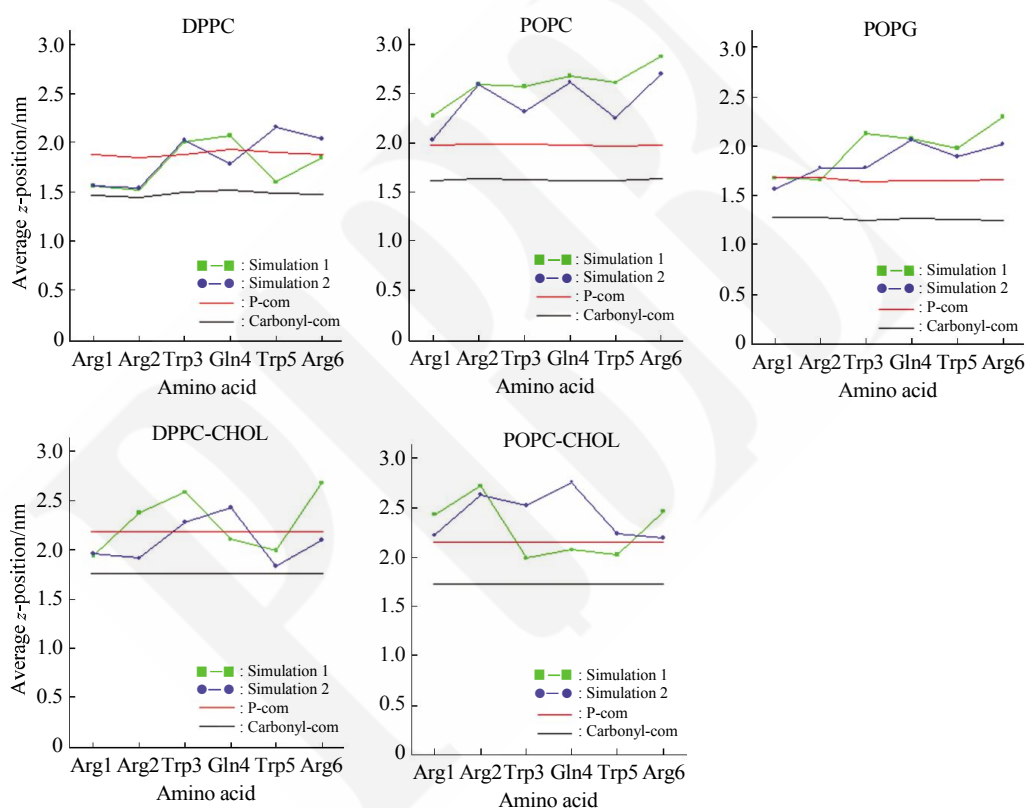


Fig. 4 The average distance along the z axis between the center of each amino acid residues and the center of the lipid membrane for the last 200 ns

2.3 小肽与细胞膜以及水分子形成的氢键数随时间变化

图 5 给出了 500 ns 的模拟时间内 BLFcin6 小肽与不同磷脂膜以及水分子形成的氢键数目随时间的变化, 横坐标表示时间(ns), 纵坐标表示形成的氢键个数。黑色和红色的线分别表示小肽与磷脂膜以及小肽与水分子形成的氢键数目随时间的变化。从图中可以看出: 体系 I 中的 BLFcin6 小肽与 DPPC 膜生成的氢键数逐渐增加, 最终维持在 25 个左右,

而小肽与水形成的氢键数目逐渐减少, 最终在 15 个左右; 体系 II 和体系 V 中的小肽与水生成的氢键数比较多且稳定, 在 30~40 之间, 但小肽与膜生成的氢键数极少, 低于 10 个; 体系 III 中, 小肽与 POPG 膜生成的氢键数逐渐上升, 维持在 18 个左右, 小肽与水生成的氢键数目在 20~40 之间波动; 体系 IV 中小肽与 DPPC-CHOL 膜生成的氢键数逐渐上升, 小肽与水生成的氢键数逐渐下降, 最后两者的数目几乎相等, 维持在 20 个左右; 总的来说,

小肽与 DPPC 膜生成的氢键数目最多, 与 DPPC-CHOL 膜和 POPG 膜生成的氢键数次之, 与 POPC

膜和 POPC-CHOL 膜生成的最少, 这与小肽是否进入膜以及进入膜的位置的结果相一致.

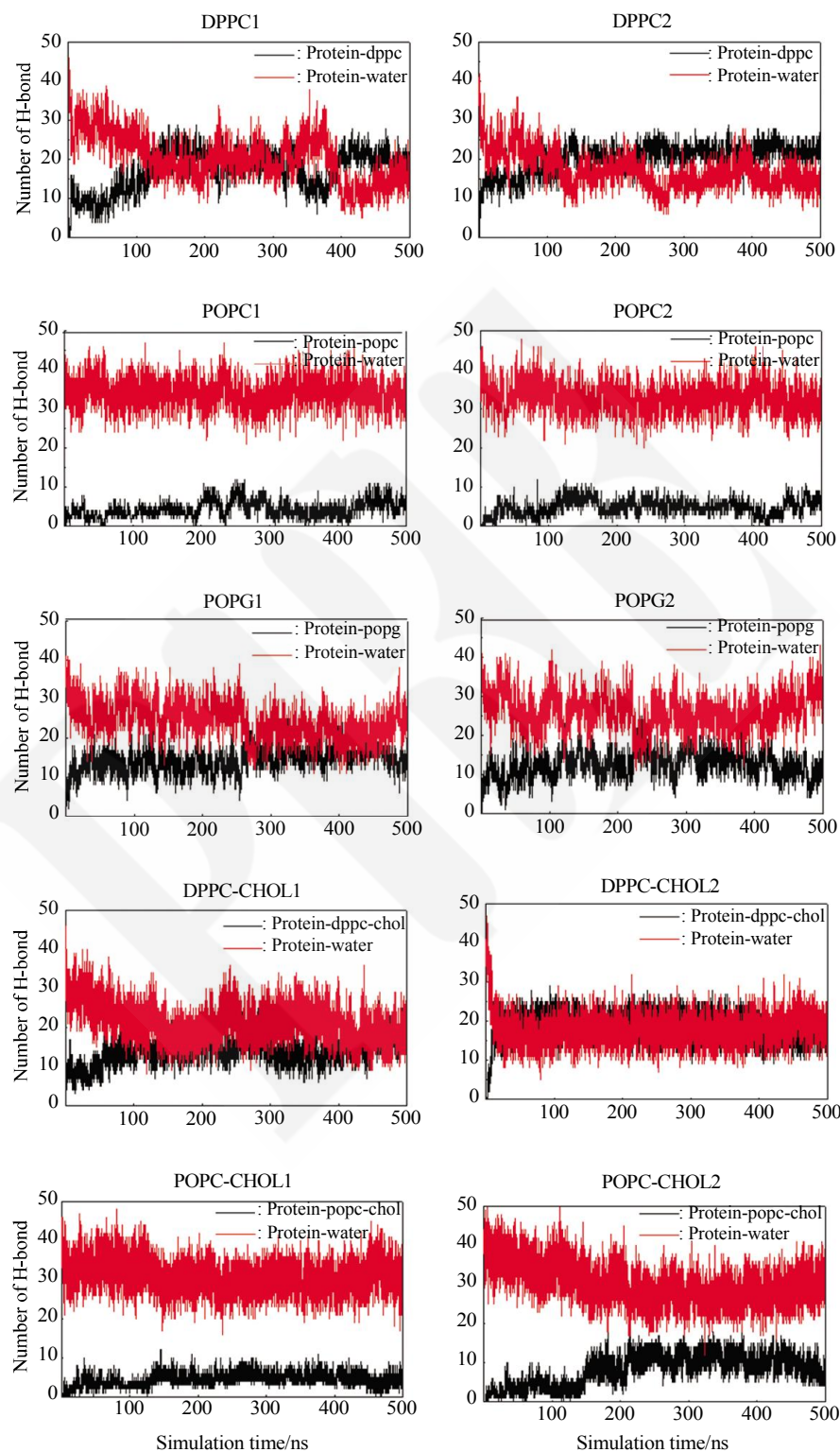


Fig. 5 The number of hydrogen bond between the peptide and membrane as well as water molecules in the 500 ns

2.4 小肽与不同磷脂膜的相互作用能

为了比较小肽与不同磷脂膜相互作用的强度, 本文采用 GROMACS 中的 $g\_mmpbsa^{[37]}$ 计算了小肽

与细胞膜之间的结合自由能, 如表 2 所示. 表 2 列出了这 5 组模拟体系(每组体系有 2 组模拟)最后 200 ns 的模拟时间内小肽与不同磷脂膜的范德华相

互作用(ΔE_{vdw})、静电相互作用(ΔE_{elec})、极性相互作用(ΔG_{polar})、非极性相互作用($\Delta G_{\text{non-polar}}$)和总的结合能(binding energy). 其中体系Ⅳ和体系Ⅴ中分别计算了小肽 - 磷脂膜和小肽 - 胆固醇的相互作用能. 从表 2 可以看出, 每组模拟体系中的 2 组模拟所得的结果相差不大. 从不同的模拟系统中得到的 ΔE_{vdw} 是相似的, 体系Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ中, ΔE_{elec} 比 ΔE_{vdw} 相互作用更强, 表明在肽 - 膜的相互作用中静电相互作用占主导地位. 小肽与 POPG 膜的 ΔE_{elec} 值最大, 与 DPPC 膜和 DPPC-CHOL 膜的 ΔE_{elec} 次之, 与 POPC 膜的 ΔE_{elec} 较弱, 与 POPC-CHOL 膜的 ΔE_{elec} 最弱. ΔE_{elec} 的差异主要来源于: 一是细胞膜的成份不同, 二是小肽与细胞膜之间的距离不同.

小肽与细菌模式膜 POPG 的结合能最强, 其次是 DPPC-CHOL 膜和 DPPC 膜, 结合最弱的是 POPC 膜和 POPC-CHOL 膜. 因此多种细胞膜相比, 小肽更倾向于同 POPG 膜结合. 为了比较小肽更倾向于同细胞膜的哪部分相互作用, 将细胞膜分成亲水头部和疏水尾部. 图 6 给出了小肽与 DPPC 膜、POPG 膜、DPPC-CHOL 膜以及 POPC-CHOL 膜的亲水头部与疏水尾部的结合能. 对 DPPC 膜与 DPPC-CHOL 膜而言, 小肽更倾向于同 DPPC 膜的疏水尾部相互作用, 结合能为负; 而更倾向于同 DPPC-CHOL 膜的亲水头部相互作用. 而对其他几种细胞膜, 小肽更倾向于同细胞膜的亲水头部相互作用, 其中小肽与 POPG 膜的相互作用最强.

Table 2 The interaction energy of BLFcin6 peptide with different lipid bilayer for the last 200 ns

	ΔE_{vdw}	ΔE_{elec}	ΔG_{polar}	$\Delta G_{\text{non-polar}}$	Binding energy
					$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
DPPC 1	-2.3	-9.2	10.6	-2.4	-3.3
DPPC 2	-1.4	-10.6	11.6	-2.4	-2.8
POPC 1	-1.3	-4.3	5.0	0.6	-0.02
POPC 2	-1.5	-3.6	4.8	0.6	0.3
POPG 1	-1.5	-71.2	12.4	-3.1	-63.4
POPG 2	-1.3	-69.2	9.8	-3.1	-63.8
DPPC-CHOL1_DPPC	-1.7	-10.0	9.6	-1.9	-4.1
DPPC-CHOL1_CHOL	-0.3	-0.2	0.9	0.1	0.5
DPPC-CHOL2_DPPC	-2.8	-12.7	19.2	-2	1.6
DPPC-CHOL2_CHOL	-0.5	-0.2	0.5	0.1	0.1
POPC-CHOL1_POPC	-2.0	-1.4	3.9	0.5	1.0
POPC-CHOL1_CHOL	-0.1	0.1	0.5	0.1	0.6
POPC-CHOL2_POPC	-2.0	-3.3	5.8	0.5	0.9
POPC-CHOL2_CHOL	-0.2	-0.9	2.3	0.0	1.2

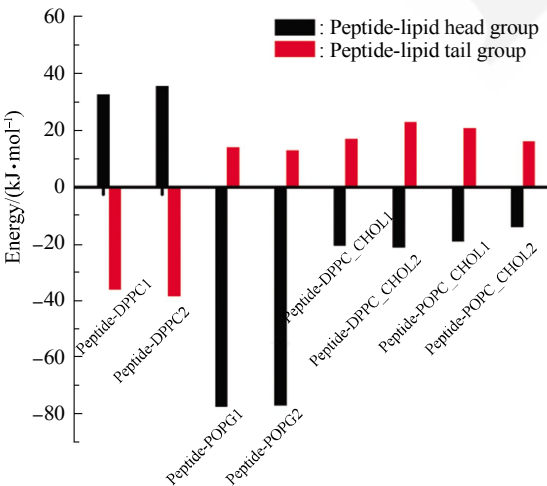


Fig. 6 The interaction energy of bLFcin6 peptide with four different bilayer (per lipid)

The interaction energy is calculated for peptide-lipid head group and peptide-lipid tail group.

3 讨 论

无论抗菌肽采用哪种抗菌机制, 首先要确定抗菌肽能否并且如何稳定地吸附到细胞膜之上. 因此, 本文采用 5 种不同细胞膜, 包括哺乳动物细胞膜(含饱和碳碳双键及不饱和碳碳双键)、细菌细胞膜和加了胆固醇的细胞膜, 并利用分子动力学模拟方法比较了 BLFcin6 小肽与 5 种不同细胞膜之间的相互作用. 通过计算小肽质心与不同细胞膜质心的距离随模拟时间变化情况, 可以看出小肽结合在 POPG 膜和 DPPC-CHOL 膜的表面, 倾向于进入 DPPC 膜的疏水内部, 500 ns 的模拟时间内与 POPC-CHOL 膜的接触时间很短, 没有与 POPC 膜接触. DPPC 膜与 POPC 膜相比, POPC 膜的疏水尾部多了一个 C=C 双键, 可能影响了小肽与

POPC 膜的相互作用。加入胆固醇以后, 小肽没有进入到 DPPC-CHOL 膜的疏水内部, 是由于胆固醇分子散布于磷脂分子之间, 其极性头部紧靠磷脂分子的极性头部, 其强硬的甾环结构则使与之相邻的磷脂烃链的一部分不易活动, 使膜的刚性增强, 小肽更难进入膜内。已有研究发现, 高胆固醇含量增加了脂质双分子层中脂质的秩序, 而且由于脂质秩序的增加, 胆固醇分子更加垂直地排列在脂质双分子层中, 膜的厚度也因为胆固醇的加入而变厚^[38]。计算 500 ns 的模拟时间内小肽与不同磷脂膜以及水生成的氢键数发现, 小肽与膜生成的氢键数目与小肽进入膜的位置的结果相一致, 说明小肽进入膜的位置越深, 小肽与膜生成的氢键数目越多。通过计算小肽与不同磷脂膜的相互作用能发现, 小肽与 DPPC 膜的疏水尾部作用较强, 与模拟中小肽进入 DPPC 膜的羰基碳部位相一致; 小肽与 POPG 膜的相互作用最强。以上结果分析表明: 小肽在与 5 种不同细胞膜作用时, 与 POPG 膜的相互作用最强, 作用部位是亲水头部, 与 DPPC 膜和 DPPC-CHOL 膜的相互作用次之, 小肽倾向于进入 DPPC 膜的疏水尾部, 但受胆固醇的影响, 小肽只结合在 DPPC-CHOL 膜表面, 与 POPC 膜和 POPC-CHOL 膜的相互作用最弱, 很难结合在细胞膜表面。

通过计算 500 ns 模拟时间内小肽不同的氨基酸到膜质心的距离变化以及最后 200 ns 氨基酸到膜质心的平均距离, 发现精氨酸残基在小肽结合细胞膜的过程中起着重要的作用。对 DPPC 膜、DPPC-CHOL 膜及 POPG 膜而言, 小肽的 N 端 Arg 残基首先与膜接触, Arg 带正电荷, 与细胞膜的亲水头部存在很强的静电相互作用。基于分子动力学模拟研究 BLFcin6 小肽与 5 种不同细胞膜的相互作用, 我们得到了小肽 - 细胞膜相互作用的强度、关键残基等信息, 这些研究能为进一步分析抗菌肽的活性以及抗菌机制提供帮助。关于 BLFcin6 小肽抗菌性的研究, 我们可以搭建更接近于生理环境下的细菌细胞膜、癌细胞膜, 进一步比较不同细胞膜成分对小肽 - 细胞膜相互作用的影响, 比如含有 DPPC、POPE、POPS 以及胆固醇的混合磷脂膜。另一方面, 还可以对 BLFcin6 小肽进行改造, 设计成具有肿瘤靶向的穿膜肽, 比如前面提到的 MPLfcinB6, 既能够降低传统抗肿瘤药物的副作用, 又能够提高利用率, 将会大大提高穿膜肽在肿瘤靶向方面的应用。

参 考 文 献

- [1] 王建忠, 徐汉江, 陈 晶, 等. 抗菌肽研究进展. 世界最新医学信息文摘: 连续型电子期刊, 2016, **16**(72): 77-82
Wang J Z, Xu H J, Chen J, *et al.* World Latest Medicine Information, 2016, **16**(72): 77-82
- [2] 黎观红, 洪智敏, 贾永杰, 等. 抗菌肽的抗菌作用及其机制. 动物营养学报, 2011, **23**(4): 546-555
Li G H, Hong Z M, Jia Y J, *et al.* Chinese Journal of Animal Nutrition, 2011, **23**(4): 546-555
- [3] Sevcik E, Pabst G, Richter W, *et al.* Interaction of LL-37 with model membrane systems of different complexity: influence of the lipid matrix. Biophysical Journal, 2008, **94**(12): 4688-4699
- [4] Khandelia H, Ipsen J H, Mouritsen O G. The impact of peptides on lipid membranes. Biochimica Et Biophysica Acta, 2008, **1778**(7-8): 1528-1536
- [5] Powers J P, Hancock R E. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. Peptides, 2003, **24**(11): 1681-1691
- [6] Oren Z, Lerman J C, Gudmundsson G H, *et al.* Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. The Biochemical J, 1999, **341** (Pt 3): 501-513
- [7] Ludtke S J, He K, Heller W T, *et al.* Membrane pores induced by magainin. Biochemistry, 2013, **35**(43): 13723-13728
- [8] Li Z L, Ding H M, Ma Y Q. Interaction of peptides with cell membranes: insights from molecular modeling. J Phys Condens Matter, 2016, **28**(8): 083001
- [9] Hancock R E. Peptide antibiotics. Lancet, 1997, **349**(9049): 418-422
- [10] Matsuzaki K, Sugishita K, Harada M, *et al.* Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. Biochim Biophys Acta, 1997, **1327**(1): 119-130
- [11] Mader J S, Salsman J, Conrad D M, *et al.* Bovine lactoferricin selectively induces apoptosis in human leukemia and carcinoma cell lines. Molecular Cancer Therapeutics, 2005, **4**(4): 612-624
- [12] Nguyen L T, Chau J K, Perry N A, *et al.* Serum stabilities of short tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptide analogs. Plos One, 2010, **5**(9): e12684
- [13] Arias M, Hilchie A L, Haney E F, *et al.* Anticancer activities of bovine and human lactoferricin-derived peptides. Biochemistry and Cell Biology, 2016, **95**(1): 91-98
- [14] Huertas Méndez N J, Vargas C Y, Gómez Chimbi A K, *et al.* Synthetic peptides derived from bovine lactoferricin exhibit antimicrobial activity against *E. coli* ATCC 11775, *S. maltophilia* ATCC 13636 and *S. enteritidis* ATCC 13076. Molecules, 2017, **22**(3): E452
- [15] Richardson A, De A R, Duncan R, *et al.* Intracellular delivery of

- bovine lactoferricin's antimicrobial core (RRWQWR) kills T-leukemia cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2009, **388**(4): 736–741
- [16] Hilchie A L, Vale R, Zemlak T S, *et al.* Generation of a hematologic malignancy-selective membranolytic peptide from the antimicrobial core (RRWQWR) of bovine lactoferricin. *Experimental & Molecular Pathology*, 2013, **95**(2): 192–198
- [17] Perilla J R, Goh B C, Cassidy C K, *et al.* Molecular dynamics simulations of large macromolecular complexes. *Current Opinion in Structural Biology*, 2015, **31**: 64–74
- [18] 吴建华, 刘 黎, 方 颖, 等. 抗菌肽 HP(2-20)与 POPE 脂膜相互作用的分子动力学模拟. *华南理工大学学报 (自然科学版)*, 2012, **40**(10): 211–218
- Wu J H, Liu L, Fang Y, *et al.* *Journal of South China University of Technology(Natural Science Edition)*, 2012, **40**(10): 211–218
- [19] Kyriakou P K, Bie E, Kristiansen P E, *et al.* Interactions of a class II b bacteriocin with a model lipid bilayer, investigated through molecular dynamics simulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2016, **1858**(4): 824–835
- [20] Andersson M, Ulmschneider J P, Ulmschneider M B, *et al.* Conformational states of melittin at a bilayer interface. *Biophysical Journal*, 2013, **104**(6): 12–14
- [21] Manna M, Mukhopadhyay C. Molecular dynamics simulations of the interactions of kinin peptides with an anionic POPG bilayer. *Langmuir the Acs Journal of Surfaces & Colloids*, 2011, **27**(7): 3713–3722
- [22] Liu C, Faller R. Conformational, dynamical. and tensional study of tethered bilayer lipid membranes in coarse-grained molecular simulations. *Langmuir the Acs Journal of Surfaces & Colloids*, 2012, **28**(45): 15907–15915
- [23] Hess B, Kutzner C, Van D S D, *et al.* GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *Journal of Chemical Theory & Computation*, 2008, **4**(3): 435–447
- [24] Oostenbrink C, Soares T A, Nf V D V, *et al.* Validation of the 53A6 GROMOS force field. *European Biophysics Journal*, 2005, **34**(4): 273–284
- [25] Berger O, Edholm O, Jähnig F. Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. *Biophysical Journal*, 1997, **72**(5): 2002–2013
- [26] Berendsen H J C, Postma J P M, Gunsteren W F V, *et al.* Interaction models for water in relation to protein hydration [M]. Springer Netherlands, 1981, **14**(1): 331–342
- [27] Saini A, Jaswal R R, Negi R, *et al.* Insights on the structural characteristics of Vim-TBS (58-81) peptide for future applications as a cell penetrating peptide. *Bioscience Trends*, 2013, **7**(5): 209–220
- [28] Pourmousa M, Wongekkabut J, Patra M, *et al.* Molecular dynamic studies of transportan interacting with a DPPC lipid bilayer. *Journal of Physical Chemistry B*, 2013, **117**(1): 230–241
- [29] Dunkin C M, Pokorny A, Almeida P F, *et al.* Molecular dynamics studies of transportan 10 (Tp10) interacting with a POPC lipid bilayer. *Journal of Physical Chemistry B*, 2011, **115**(5): 1188–1198
- [30] Nagle J F. Evidence of partial rotational order in gel phase DPPC. *Biophysical Journal*, 1993, **64**(4): 1110–1112
- [31] Tieleman D P, Forrest L R, Sansom M S, *et al.* Lipid properties and the orientation of aromatic residues in OmpF, influenza M2, and alamethicin systems: molecular dynamics simulations. *Biochemistry*, 1998, **37**(50): 17554–17561
- [32] Dickey A N, Faller R. Behavioral differences between phosphatidic acid and phosphatidylcholine in the presence of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biophysical Journal*, 2008, **95** (12): 5637–5647
- [33] Kawamoto S, Takasu M, Miyakawa T, *et al.* Binding of Tat peptides on DOPC and DOPG lipid bilayer membrane studied by molecular dynamics simulations. *Molecular Simulation*, 2012, **38**(5): 366–368
- [34] Darden T, York D, Pedersen L. Particle mesh Ewald: An N-log(N) method for Ewald sums in large systems. *Journal of Chemical Physics*, 1993, **98**(12): 10089–10092
- [35] Hess B, Bekker H, Berendsen H J C, *et al.* LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 1997, **18**(12): 1463–1472
- [36] Yang Y F, Wang L, Yan S J, *et al.* Discovery Studio software in the analysis of the blood-brain barrier penetrations of active components of traditional Chinese medicines. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2011, **27**(5): 739–740
- [37] Kumari R, Kumar R, Lynn A. g_mmpbsa--a GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *Journal of Chemical Information & Modeling*, 2014, **54**(7): 1951–1962
- [38] Boughter C T, Monjegalvan V, Im W, *et al.* Influence of cholesterol on phospholipid bilayer structure and dynamics. *Journal of Physical Chemistry B*, 2016, **120**(45): 11761–11772

Study on The Interaction Between BLFcin6 and Different Phospholipid Membrane by Molecular Dynamics Simulation*

KONG Zhen-Zhen^{1,4)}, ZHAO Li-Ling^{1,2)}, TANG Yan^{1,3)}, WANG Ji-Hua^{1,2)}, CAO Zan-Xia^{1,2)**}

⁽¹⁾ Shandong Provincial Key Laboratory of Biological Physics, Dezhou University, Dezhou 253023, China;

⁽²⁾ School of Physics and Electronic Information, Dezhou University, Dezhou 253023, China;

⁽³⁾ School of Resources Environment and Planning, Dezhou University, Dezhou 253023, China;

⁽⁴⁾ School of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

Abstract Antimicrobial peptides have broad spectrum of antibacterial properties and are expected to become the better alternatives of antibiotics. Studies on the antibacterial mechanism can provide guidance for the design of new antibacterial peptides. No matter what kind of antibacterial mechanism, antibacterial peptides adsorb on the cell membrane firstly. In this manuscript, the molecular dynamic simulations were used to study the interaction between antimicrobial peptide BLFcin6 and five different membranes. For five kinds of cell membranes, the peptide combined with the surface of DPPC-CHOL membrane and POPG membrane rapidly, and tend to entered the hydrophobic interior of DPPC membrane. However, the peptide have little contact with POPC-CHOL membrane and POPC membrane. In terms of interaction energy, the peptide and POPG membrane have the strongest interaction, which mainly arise through the electrostatic interaction between the pepetide and the hydrophilic head of POPG membrane. For peptide and DPPC membrane, the interaction are mainly arise between the peptide and the hydrophobic tail of DPPC membrane. However, the peptide only combined with the surface of DPPC-CHOL membrane because of the effects of cholesterol. In the process of combination, the N-terminal Arginine residues contact with the cell membrane firstly, electrostatic interaction plays a key role in the process of peptide anchor in the cell membrane. The research explain why BLFcin6 peptide have antibacterial effect at the atomic level, which are the key residues, and also provide help for the further study of BLFcin6 peptide and its derivatives.

Key words BLFcin6 antimicrobial peptide, different compositions of the phospholipid membrane, molecular dynamics simulation, peptide-membranes interaction

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0256

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31670727, 61671107), Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2016CQ15, ZR2014AL014) and Technology Development Project of Shandong Province (2014GNC110025).

**Corresponding author.

Tel: 86-534-8985879, E-mail: qiayilai@mail.ustc.edu.cn

Received: July 5, 2017 Accepted: October 13, 2017