

西藏波氏琵琶蝎防御素 SPDef4 的制备与抗菌功能研究

兰祝璇, 秦向雅, 张丽蓉, 龙海庆, 谭喜影, 尹世金*

(中南民族大学 药学院, 湖北 武汉 430074)

摘要 研究原核表达制备西藏波氏琵琶蝎毒腺中防御素多肽 SPDef4 (*Scorpiops pococki* defensin 4, SPDef4), 并检测其抗菌活性, 初步探究其抗菌机制. 通过大肠杆菌表达系统重组表达获得 SPDef4. 通过肉汤稀释法测定 SPDef4 的最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC), DMAO/PI 双染色结合共聚焦显微镜及透射电镜检测 (transmission electron microscopy, TEM) 初步探究了抗菌机制. 通过重组表达获得的 SPDef4 能有效抑制革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的生长, 然而对革兰氏阴性菌大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 则未观察到明显抑制作用. DMAO/PI 双染色结果提示 SPDef4 通过破坏细胞膜完整性起到抗菌作用. 西藏波氏琵琶蝎防御素 SPDef4 是蝎源抗菌肽家族的新成员, 并展现出抗菌活性, 未来研究可对其抗菌谱范围进行扩大检测, 发掘其作为新型广谱抗菌肽的潜力.

关键词 波氏琵琶蝎; 防御素; 原核表达; 抗菌活性

中图分类号 Q816; Q812 文献标志码 A 文章编号 1672-4321(2026)06-0788-08

doi: 10.20056/j.cnki.ZNMDZK.20260736

Preparation and antimicrobial function research of a defensin polypeptides SPDef4 from *Scorpiops pococki* in Xizang

Lan Zhuxuan, Qin Xiangya, Zhang Lirong, Long Haiqin, Tan Xiying, Yin Shijin*

(School of Pharmaceutical Sciences, South-Central Minzu University, Wuhan 430074, Hubei China)

Abstract This study was designed to produce the defensin peptide SPDef4 (*Scorpiops pococki* defensin 4) via prokaryotic expression, evaluate its antimicrobial activity, and preliminarily explore its mechanism of action. SPDef4 was recombinantly expressed using an *Escherichia coli* expression system. The minimum inhibitory concentration (MIC) of SPDef4 was determined using the broth dilution method. Preliminary elucidation of antibacterial mechanisms via DMAO/PI dual staining in conjunction with confocal and transmission electron microscopy (TEM). Recombinant SPDef4 exhibits antibacterial activity against the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*, with no efficacy observed against the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. DMAO/PI double staining and transmission electron microscopy results suggest that SPDef4 exerts its antibacterial effect by disrupting cell membrane integrity. The defensin SPDef4 emerges as a novel member of scorpion-derived antimicrobial peptides with notable antibacterial activity. Future investigations should expand its antibacterial spectrum assessment and explore its potential as a broad-spectrum antimicrobial agent.

Keywords *Scorpiops pococki*; defensin; prokaryotic expression; antimicrobial activity

随着抗生素耐药性问题的日益严重, 寻找新型抗菌剂成为全球医药领域的研究热点之一, 而抗菌肽因其广谱、高效的抗菌活性和低耐药性, 备受关

注^[1]. 防御素是一类富含半胱氨酸的小分子阳离子抗

菌肽, 广泛存在于生物体的不同组织和细胞中, 是生物免疫系统中的重要调节分子. 自 1985 年加州大学的 Dr. Robert Lehrer 首次发现并命名防御素起^[2-3], 人们已经鉴定出了四百余种防御素, 根据来源不同,

收稿日期 2025-10-28

* 通信作者 尹世金 (1974-), 男, 教授, 博士, 研究方向: 离子通道药理学, E-mail: yinshijinyf@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (81373379, 81641186); 湖北省自然科学基金资助项目 (2024AFD262)

可分为虫防御素、无脊椎动物防御素、植物防御素、脊椎动物防御素和未分类的防御素。防御素通常由18-45个氨基酸组成,其核心特征为含有6个保守的半胱氨酸残基,可形成3对分子内二硫键,这种特殊结构赋予其稳定的三维构象和强大的病原体结合能力^[4]。

防御素在体内和体外对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均具有广谱抗菌活性,部分防御素在抗真菌和抗病毒中也表现出良好的效果^[5]。防御素作为天然阳离子抗菌肽,主要通过细菌细胞质膜相互作用发挥抗菌活性,其抗菌机制包括通过静电作用破坏膜屏障^[6]、抑制细菌细胞壁的生物合成^[7]、抑制细菌生物膜的形成^[8]、在细菌周围形成捕获纳米网^[9]等,抗菌机制的多样性与通过靶向特定细菌蛋白或途径来实现抗菌功能的传统抗生素形成对比,使得细菌难以获得抗性,从而避免产生耐药性。

蝎子作为一种古老的节肢动物,毒液中含有丰富的生物活性肽,数亿年的自然进化选择使蝎毒素多肽表现出高活性、高特异性、结构多样性^[10],成为药物开发和设计的潜在资源库。随着分子生物学的发展,研究人员对蝎源防御素结构及功能的研究取得了显著进展,同时也设计出了许多具有良好药理活性的衍生肽。从非洲皇帝蝎中分离出的scorpine,不仅具有抗菌活性,还具有抗疟疾效果^[11];Scorpion衍生肽GK8以多模式方式杀死铜绿假单胞菌细胞(包括临床耐药菌株),并在小鼠皮肤皮下感染模型中,对铜绿假单胞菌感染表现出良好的体内活性^[12]。东亚钳蝎来源的防御素BmKDfsin4对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均表现出良好的抗菌活性,同时也是首个被证实可阻断钾通道(Kv1.1/Kv1.3)的无脊椎动物防御素^[13-14];BmKDfsin4衍生环肽buthicyclin具有显著的镇痛效果,在急性和炎症疼痛模型中均表现出比吗啡更强且更持久的镇痛作用,同时具有低毒性和良好的安全性^[15]。

本研究从课题组构建的西藏波氏琵琶蝎毒腺转录组cDNA文库中筛选到一条毒素多肽编码基因SPDef4,通过对其氨基酸序列进行分析,发现其与已知防御素具有较高同源性,同时6个保守半胱氨酸也与防御素典型结构特征相符,推测其可能属于蝎源防御素。由于从天然毒液中提取产量极低,为对其生物活性进行研究,通过大肠杆菌表达系统重组表达获得活性多肽,并对其最小抗菌浓度(MIC)进行了测定,对细胞膜完整性影响进行了评估,初步探究了SPDef4的抗菌活性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

质粒 pGEX-4T-1 及大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 菌株 DH5 α 、*E. coli* Rosetta (DE3) 由本实验室保存, Taq 酶、连接酶、核酸染料 (gel red)、PCR 产物纯化试剂盒 (诺唯赞); 限制性内切酶 (*Bam*H I、*Xho* I)、DNA marker (Takara); 氨苄霉素、IPTG、谷胱甘肽 (GSH, 瑞诺德), 酵母提取物、胰蛋白胨 (上海生工)、TEV 酶 (翌圣生物)、蛋白质分子量标准 (10-150 kD, 碧云天); MHB 培养基 (Solarbio); 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* AB94004、大肠杆菌 *E. coli* ATCC25922 菌株均由湖北工业大学曹志贱教授课题组提供, 96 孔板、一次性无菌接种环 (Biosharp); 细菌死活染色试剂盒 (碧云天), 电镜固定液 (赛维尔生物), 磷钨酸负染色液 (2%, 索莱宝); 其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 重组表达载体构建

从本实验室西藏波氏琵琶蝎毒腺 cDNA 文库中筛选得到一段蝎毒素多肽基因序列 SPDef4, 经大肠杆菌密码子优化及碱基修饰, 加入 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点以及 TEV 酶切位点, 设计出 2 对重叠延伸 PCR 引物 (表 1)。通过 overlap PCR 扩增、酶切、连接至 pGEX-4T-1 载体并转入 DH5 α 感受态细胞, 阳性克隆经 PCR 筛选与测序验证后构建表达载体 pGEX-4T-1-SPDef4。

表 1 SPDef4 引物序列

Tab. 1 Primer sequences of SPDef4

引物名称	引物序列 (5'-3')
SPDef4-FP1	CTGGGATCCGAAAACCTGTACTTCCAGGGTCAGT
	CTGGTTGCCCCGAAC 下划线为 <i>Bam</i> H I 酶切位点
SPDef4-FP2	TCTGGTTGCCCCGAACAGCTTCAGCTGTAACCTCTC
	TTGTCTCGCTCGC
SPDef4-RP1	CCGCTCGAGTTAGGTACATTCCGAGAACTGACGC
	ATCGCACCCCAACA 下划线为 <i>Xho</i> I 酶切位点
SPDef4-RP2	CATCGCACCCCAACAGTAACCACTTTGTAGCCG
	CGACGCAGACAAGA

1.3 GST融合蛋白表达与纯化

将测序正确的重组质粒转入 *E. coli* Rosetta (DE3) 菌株, 挑取的阳性菌株于含氨苄抗生素的 LB 液体培养基中, 37 °C 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 时, 通过改变 IPTG 的浓度 (设置 0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L 四个浓度梯度) 和诱导时间 (设置 4、5 h 两个时间梯度) 来优

化GST-SPDef4融合蛋白表达的条件.诱导表达蛋白经SDS-PAGE蛋白凝胶电泳和考马斯亮蓝染色确定最优的诱导表达条件.

根据优化的诱导表达条件,阳性菌株在含氨苄抗生素的LB培养基37℃培养至 OD_{600} 为0.6~0.8时,加入终浓度为1 mmol/L的IPTG进行诱导,28℃继续培养5 h,离心收集菌体,超声破碎,再次离心取上清液,采用GST亲和层析法对GST-SPDef4融合蛋白进行分离,然后融合蛋白超滤脱盐后在22℃用TEV酶酶切14~16 h,酶切产物经RP-HPLC(C18柱)纯化分离,主峰收集后通过MALDI-TOF-MS鉴定分子量.

1.4 抗菌活性检测

微量肉汤稀释法对SPDef4的最小抑菌浓度(MIC)进行评估.将对数生长期的*S. aureus* AB94004和*E. coli* ATCC25922菌株用MHB调整至 5×10^6 CFU/mL,多肽SPDef4以0.0625~32 μ mol/L的浓度进行梯度稀释,以多肽100 μ L+菌液100 μ L比例分别接种于96孔板.对照组:PC:阳性对照(含细菌但不含Amp的MHB);NC:阴性对照(含Amp但不含细菌的MHB).在37℃孵育16 h后,测定OD值,以明显无细菌生长的最低药物浓度为MIC.每次平行3组,重复三次.

1.5 细菌细胞膜完整性检测

将对数生长期的*S. aureus* AB94004和*E. coli* ATCC25922菌株用MHB调整至 5×10^6 CFU/mL,在37℃下与SPDef4以梯度浓度(1×MIC、2×MIC)共培养12 h,使用细菌死活染色试剂盒进行双荧光染色.共聚焦激光扫描显微镜(蔡司LSM900,德国)成像;DMAO使用488 nm激发光,500~550 nm发射光收集;PI使用543 nm激发光,600~650 nm检测光.图像定量分析使用ImageJ分析软件完成.

将对数生长期的*S. aureus* AB94004菌株用MHB调整至 5×10^6 CFU/mL,在37℃下与1×MIC SPDef4共培养12 h,经过抗菌肽处理与未处理的细菌悬液与等体积电镜固定液混匀后避光静置30 min,分别滴加在Formvar/carbon支持膜铜网上,静置.用滤纸吸除多余液体后重复吸附一次并晾干,随即用2%的磷钨酸溶液对样品进行负染.样品在透射电镜(Talos F200X STEM,美国)下观察.

2 结果

2.1 SPDef4的一级结构分析

SPDef4先导cDNA序列全长331 bp,分别由5'

未翻译区(5' UTR)、开放阅读框(ORF)和3'未翻译区(3' UTR)3部分组成,其中5' UTR区长45 bp,3' UTR全长112 bp,在3' UTR区可见AATAAA加尾型号(图1(a)).ORF编码区编码58个氨基酸残基的前肽,在线预测提示SPDef4前肽中含有23个氨基酸残基构成的信号肽,其后为35个氨基酸残基构成的成熟肽,成熟肽中氨基酸序列显示具有4对二硫键用于其空间结构的维持.根据NCBI同源序列比对结果可发现,SPDef4一级结构与已报道防御素具有较高的同源性,且二硫键配对方式也一致(图1(b)),后通过EBI Clustal Omega对同源比对结果构建系统发生树(图1(c)),结果显示这些多肽总体上大致可分为两个家族,提示SPDef4可能属于防御素家族,是一种防御素多肽.

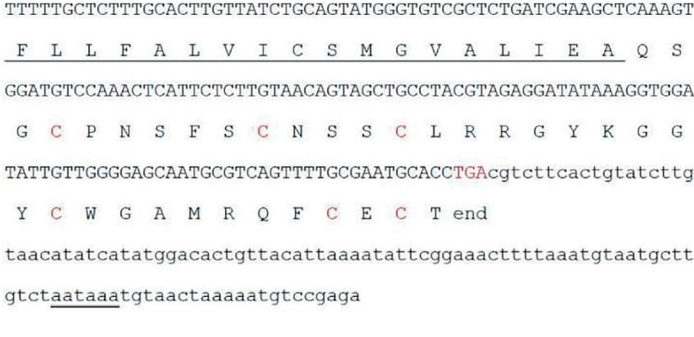
2.2 pGEX-4T-1-SPDef4重组表达载体的构建与鉴定

鉴于课题组以往毒素多肽采用pGEX-4T-1质粒为表达载体可以获得较为理想的结果^[16],利用BamH I和Xho I内切酶将SPDef4多肽编码基因插入到pGEX-4T-1质粒的多克隆位点中,构建pGEX-4T-1-SPDef4原核重组表达载体(图2(a)).通过2轮overlap PCR扩增得到全长片段,琼脂糖凝胶电泳检测可见约150 bp的亮带,与理论碱基数值相符(图2(b)).对PCR扩增产物和pGEX-4T-1质粒进行BamH I和Xho I双酶切连接转化后,PCR阳性鉴定表明获得含有pGEX-4T-1-SPDef4重组质粒的*E. coli* Rosetta(DE3)阳性菌落(图2(c)).高通量测序结果显示原核重组表达载体构建成功(图2(d)),表明本实验可以成功利用Xho I酶切位点中的起始密码子启动目的蛋白翻译.

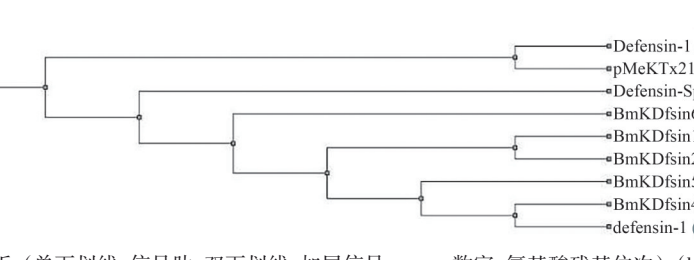
2.3 SPDef4的表达优化与GST融合蛋白表达

外源基因的诱导表达受诱导时间、诱导剂浓度、培养温度等因素影响,优化表达条件有利于获得高质量目的多肽.通过优化诱导条件发现,在37℃下培养至 OD_{600} 达到0.6~0.8时,添加1 mmol/L IPTG并在28℃诱导5 h,可获得最佳表达效果(图3).

根据优化条件,用含氨苄抗生素的LB培养基37℃培养*E. coli*至 OD_{600} 为0.6~0.8时,加入1 mmol/L IPTG并在28℃诱导5 h,经GSH亲和层析柱纯化后进行超滤浓缩脱盐,得到GST-SPDef4融合蛋白,蛋白用TEV酶酶切过夜后通过反相高效液相色谱(RP-HPLC)C18柱分离纯化.纯化峰经冷冻干燥后采用MALDI-TOF-MS鉴定分子量,检测到一个主要质谱峰:3940.451 Da,与理论相符(图4),提示成功表达并获得了理想纯度的SPDef4多肽,可用于后续功能研究.

(a) 
tacacctccaggtaacttatccacgggagcaaatgtgaagggaATGAAGATCGTGTGTTG
M K I A V 5
TTTTTGCTCTTTGCACTTGTATCTGCAAGTATGGGTGTCGCTCTGATCGAAGCTCAAAGT
F L L F A L V I C S M G V A L I E A Q S 25
GGATGTCCAAACTCATTTCTCTTGTAAACAGTAGCTGCCTACGTAGAGGATATAAAGTGGA
G C P N S F S C N S S C L R R G Y K G G 45
TATTGTTGGGGAGCAATGCGTCAGTTTTGCGAATGCACCTGA^cgttcttcactgtatcttg
Y C W G A M R Q F C E C T end 58
taacatatcatatggacactgttacattaaaatattcggaaacttttaaatgtaatgctt
gtctaataaatgtaaactaaaatgtccgaga

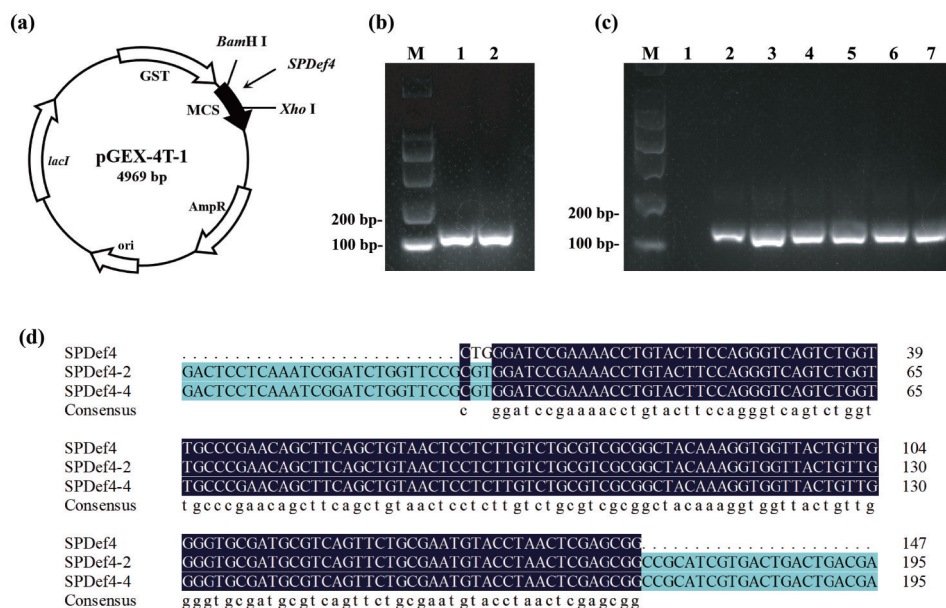
(b) 
SPDef4 . MKI AVLLFLALVI CSNGVALI EASGCP. NSFSCNSSGLRRGYKCYCYCAMR. QFGEET. 58
BmKDfsin6_P0DQU1.1 MKVI AILFLLAFVLCIMEI TMVEAGF CCIPLFQFADSHRGVGRKCYCGCNFK. LIGLEV 61
defensin-1_AIX87626.1 MKTI VLLFVLALVLCILENGVVEAGF CCFPNQGRGHRHRSI GRRGCGYGRIFFK. QTAGAYR 61
pMeKTx21-1_AIL48797.1 MKI VIVL LLLAFILCSCEIANVEAS. CGVEWR. . CNSIGI RRRYRCGICGGL LNNRYGYLS 59
BmKDfsin4_P0DQT9.1 MKTI VLLFVLALVLCILENGVVEAGF CCFPNQGRGHRHRSI GRRGCGYGRIFFK. QTAGAYR 61
BmKDfsin2_P0DQT8.1 NETI VLLFLLALVLCILENGVVEAGF CCFPNQGRGHRHRSI GRRGCGYGRIFFK. QTAGAYR 61
Defensin-1_Q6GU94.1 MKAI VVLLI LALI LCLYANTTNEG. . ACQFWS. . NSSSGI SRGYRGGYGVGI QY. KYGCGQ. 56
BmKDfsin5_P0DQU0.1 MKVI ALFFFLFAFI FCTILEVAI VEAGF CCFPLNGAGHRHRSI RRRGCGYGRIFFK. QTAGAYR 61
Consensus a c e a c c c c g c g c c

(c) 
Defensin-1 (Q6GU94.1)
pMeKTx21-1 (AIL48797.1)
Defensin-Sp4
BmKDfsin6 (P0DQU1.1)
BmKDfsin1 (P0DQT7.1)
BmKDfsin2 (P0DQT8.1)
BmKDfsin5 (P0DQU0.1)
BmKDfsin4 (P0DQT9.1)
defensin-1 (AIX87626.1)

级结构解析;(单下划线:信号肽;双下划线:加尾信号 aataaa;数字:氨基酸残基位次);(b) SPDef4成熟肽
(数字:氨基酸数目);(c) EBI Clustal Omega 构建的系统发生树

图1 SPDef4一级结构解析

Fig. 1 Primary structure analysis of SPDf4



(a) 重组质粒的构建;(b) *SPDef4* overlap PCR 扩增产物(M:DNA 分子质量 marker, 1-2:*SPDef4* 基因扩增产物所在位置);(c) 转化 pGEX-4T-1-*SPDef4* 重组表达载体的阳性菌落 PCR 鉴定结果(M:marker, 1:阴性对照, 2:阳性对照, 3~7:为挑取的阳性菌落);(d) pGEX-4T-1-*SPDef4* 重组表达载体的基因测序鉴定结果

图2 pGEX-4T-1-SPDef4重组表达载体的构建及基因鉴定结果

Fig. 2 Construction of the pGEX-4T-1-*SPDef4* recombinant expression vector and gene identification results

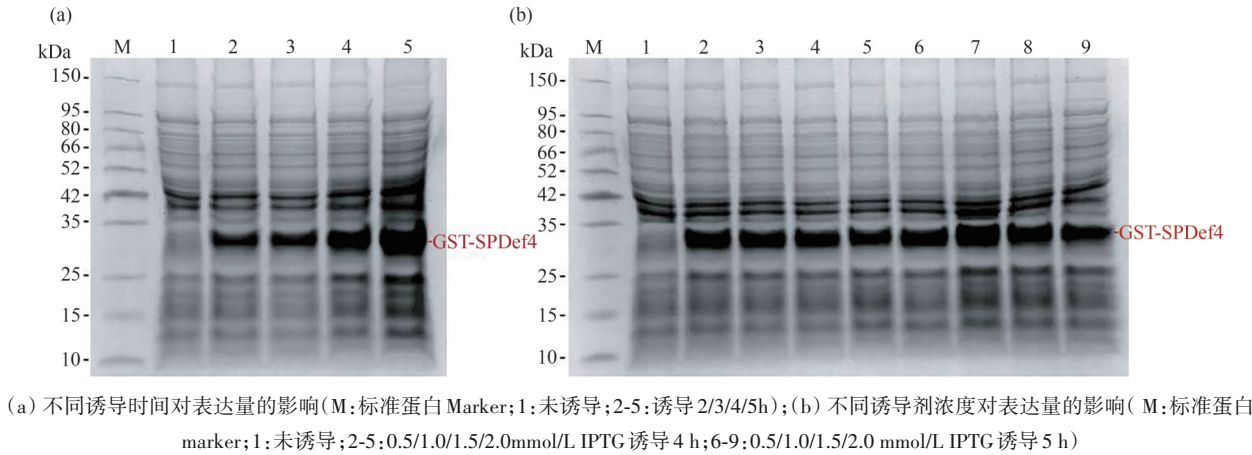


图3 不同诱导条件下表达的SPDef4的SDS-PAGE凝胶电泳分析
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of SPDef4 expressed under different induction conditions

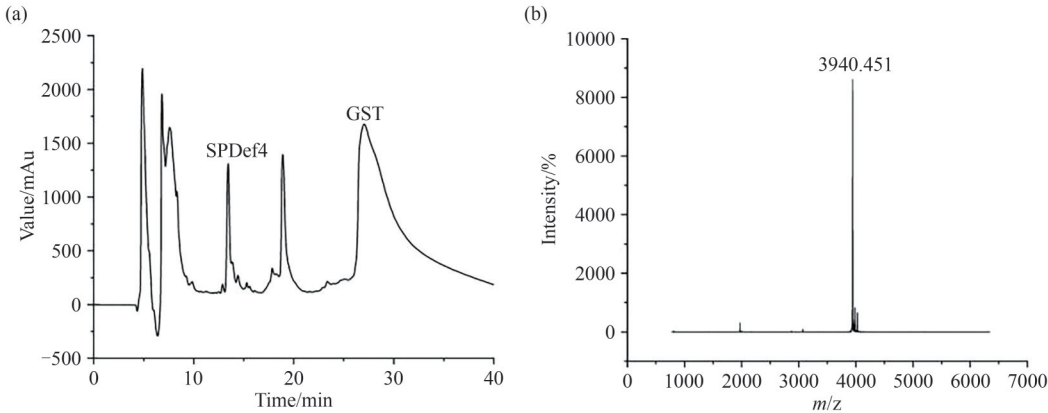


图4 SPDef4多肽的制备与质谱鉴定
Fig. 4 Preparation and mass spectrometry identification of SPDef4 peptides

2.4 抗菌活性检测

利用肉汤稀释法测定SPDef4的MIC值,结果如图5所示,SPDef4对*S. aureus* AB94004的MIC值为16 $\mu\text{mol/L}$,对*E. coli* ATCC25922的生长无明显影响(图5). 高正电荷特性有利于抗菌肽通过静电相互作用,靶向结合带负电的细菌细胞膜^[17],疏水性结构域可协助肽分子在结合至膜表面后,插入并穿透磷脂双分子层的疏水核心,破坏膜完整性,最终导致细胞内容物泄漏和细菌死亡^[18]. 这种疏水性与正电荷的协同作用,是抗菌肽发挥抗菌活性的结构基础. 分析SPDef4的氨基酸序列可发现,SPDef4含有4个精氨酸和1个赖氨酸,理论等电点为8.31,属于弱阳离子肽,含有7个疏水性氨基酸(如Phe、Leu和Ile),但也含有大量亲水性/极性氨基酸,因此SPDef4整体疏水性不高. 革兰氏阳性(G⁺)菌没有外膜,细胞壁富含磷壁酸和脂磷壁酸等大量的带负电荷分子,SPDef4的弱阳性可能已经足够使其吸附于G⁺菌发挥抗菌作用;然而革兰氏阴性(G⁻)菌拥有一个额外

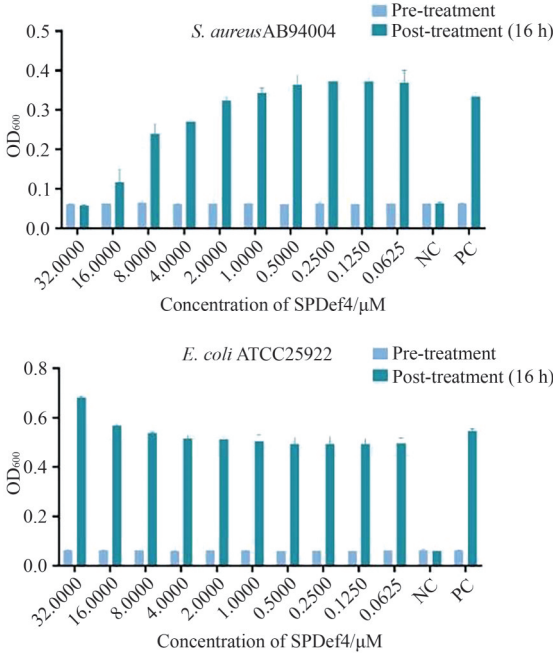


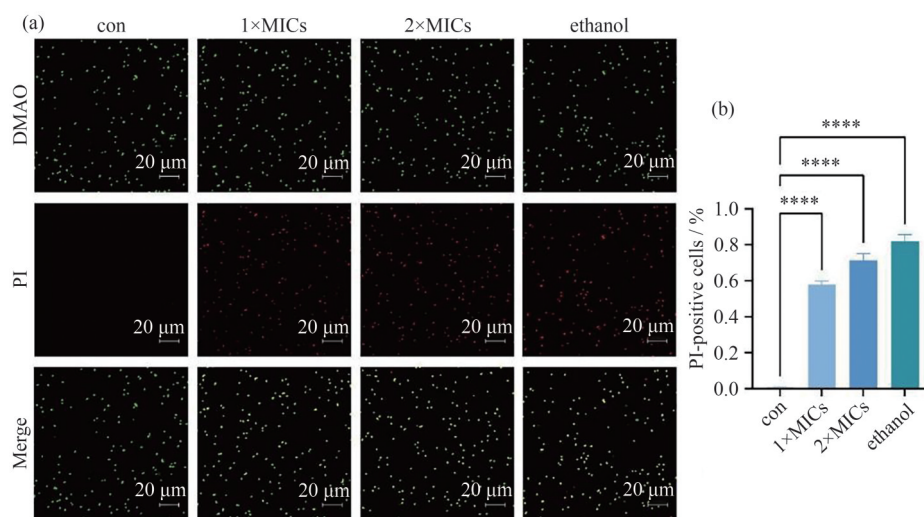
图5 肉汤稀释法测定SPDef4的MIC值($n=3$, mean $\pm$ SEM)
Fig. 5 Determination of the MIC value of SPDef4 using the broth dilution method ($n=3$, mean $\pm$ SEM)

的高度疏水性外膜,其主要成分是脂多糖(LPS),LPS的存在需要通过二价阳离子来稳定^[19]. SPDef4的弱阳性不足以竞争和置换LPS上的二价阳离子,同时弱疏水性也使其无法有效穿透G-菌紧密的膜屏障,无法发挥抗菌作用,这可能是造成SPDef4对*S. aureus* AB94004和*E. coli* ATCC25922抗菌活性存在差异的重要原因。

2.5 细菌细胞膜完整性检测

在MIC值测定中,SPDef4对*S. aureus* AB94004表现出了抗菌活性,为了进一步对其抗菌机制进行

研究,采用DMAO和PI染色结合共聚焦激光扫描显微镜(CLSM)方法,初步评估了SPDef4对细菌细胞膜完整性的影响.PI是一种红色核酸结合染料,仅能穿透细胞膜受损的细胞,而DMAO是一种绿色荧光核酸染色剂,可同时染色活体和死亡细菌.如图6所示,空白对照组中的细菌仅被DMAO染色而未被PI染色,表明大多数细胞处于活体状态.而在多肽处理的细菌中,红色荧光点数量和强度呈现浓度依赖性增加趋势,提示SPDef4对*S. aureus* AB94004细胞膜具有显著破坏作用。



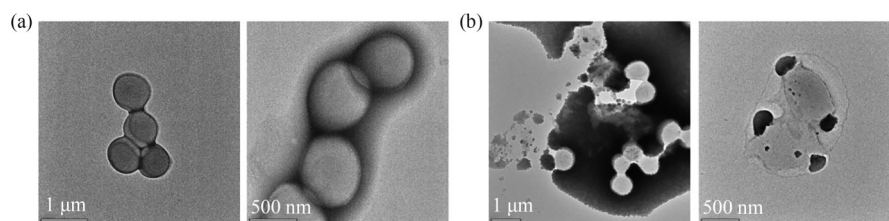
(a) 处理12h后金黄色葡萄球菌的DMAO/PI染色情况;(b) 双染叠加(Merge)黄色荧光比值($n=3$, mean $\pm$ SEM, **** $P < 0.001$).

图6 SPDef4对金黄色葡萄球菌*S. aureus* AB94004细胞膜完整性的影响

Fig. 6 Effect of SPDef4 on the cell membrane integrity of *S. aureus* AB94004

为了直观展示SPDef4对*S. aureus* AB94004的膜破坏性,通过透射电镜(TEM)进行进一步的检测与观察,对比未经处理的菌体(图7),可观察到经SPDef4处理后的菌体形态发生变化,菌膜出现一定

程度的皱缩与破损,且部分菌体膜破损严重有内容物泄露. TEM检测结果再次验证了SPDef4对*S. aureus* AB94004的抗菌活性主要通过对其细胞膜的破坏来实现。



(a) SPDef4处理前的TEM图像;(b) SPDef4处理后TEM图像

图7 *S. aureus* AB94004细胞膜完整性的TEM检测

Fig. 7 Assessment of *S. aureus* AB94004 cell membrane integrity by transmission electron microscopy

3 讨论

临床滥用导致细菌耐药性问题日益严峻,多重耐药菌的蔓延已成为全球性威胁,亟需解决^[20]. 防御素抗菌肽作为生物体天然免疫系统的核心效应分

子,兼具广谱杀菌、低耐药性与免疫调节等多重功能,为开发新一代抗感染药物提供了突破口. 其作用机制不依赖于单一靶点,而是多模式协同:凭借阳离子特性吸附于带负电的细菌膜,通过“桶板模型”或“地毯模型”形成孔道,破坏膜完整性^[21];部分防御

素可穿透细胞膜,与DNA、RNA或关键酶结合,抑制核酸合成或酶活性^[22];此外,某些防御素可干扰群体感应系统,阻断生物被膜形成,从而削弱病原体的环境适应力^[8]. 抗菌机制的多样性极大降低了耐药性产生的概率. 其次,防御素作为生物免疫系统中的重要调节分子,可通过激活宿主模式识别受体(如TLRs、NODs),触发下游MAPK与NF- κ B通路,诱导细胞因子(如IL-1 β 、TNF- α)和趋化因子的释放,招募巨噬细胞、中性粒细胞等免疫细胞,形成系统性防御网络,在杀灭病原体的同时,可通过调节宿主氧化应激水平与炎症反应,避免过度免疫损伤,维持组织稳态.

本研究围绕西藏波氏琵琶毒腺转录组中新发现的防御素类多肽SPDef4展开,从基因筛选、多肽表达制备到抗菌活性验证,系统揭示了它作为潜在抗菌剂的生物学特性与应用前景. 研究发现,SPDef4金黄色葡萄球菌 *S. aureus* AB94004 表现出抗菌活性,但对大肠杆菌 *E. coli* ATCC25922 无明显影响. 阳离子抗菌肽通常依靠静电作用吸附于带负电的细菌表面,疏水区域则协助其插入并破坏细胞膜,导致内容物泄漏和细菌死亡. 因此,阳离子电荷密度与疏水性是决定其活性的关键因素^[23],此外,G+菌和G-菌的结构差异也会影响抗菌肽发挥抗菌作用. SPDef4的弱阳性和弱疏水性可能已经足够使其吸附于G+菌发挥抗菌作用,但不足以进入革兰氏阴性菌外膜,使其对 *E. coli* ATCC25922 几乎无抗菌活性. 本研究旨在初步活性探究,仅检测了SPDef4对两种菌株的抗菌活性,后期研究将扩大其抗菌谱检测,进一步验证其对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的选择性.

本研究中,DMAO/PI双染色结果显示,SPDef4处理后 *S. aureus* AB94004 细胞膜完整性显著破坏,红色荧光强度随浓度升高而增强. TEM检测结果直观展示了SPDef4处理后 *S. aureus* AB94004 细菌膜破裂及内容物外泄,表明其对金黄色葡萄球菌的杀菌活性主要源于其对细胞膜完整性的破坏. 结合SPDef4自身阳离子性和疏水性,推测其与带负电的细菌细胞膜初始相互作用符合经典抗菌肽的作用形式. SPDef4处理后的部分细菌细胞膜发生明显的内陷和皱缩,部分细菌出现不规则裂口,内容物外泄,膜皱缩现象与“地毯模型”中抗菌肽覆盖于膜表面,改变膜张力的预期相符;细菌细胞质内容物大量外泄,膜结构完全破损,是所有膜破坏机制的最终共同结局,但不规则的膜裂口与“地毯模型”膜崩解出现大的破裂口或膜完全碎片化更加相符,而与“桶板模

型”可能形成的相对规整孔洞存在差异. 综合形态学结果,推测SPDef4的抗菌机制是一个动态、多步骤的过程,可能首先以类似“地毯模型”的方式,通过静电和疏水作用与细菌膜广泛结合,引起膜脂质重排和物理性皱缩;随着局部肽浓度积累或作用时间延长,进一步插入脂质双层,形成孔道,最终导致细胞内容物泄漏和细菌死亡. 这一动态机制假说有待后续通过实验进一步验证. 膜破坏机制与近年报道的多种蝎源防御素一致,但并非防御素抗菌的唯一机制. 因此,后续可通过转录组测序与蛋白互作实验进一步解析SPDef4是否存在多重杀菌机制,通过突变等手段进一步验证其多肽性质是否是发挥抗菌功能及抗菌特异性的关键.

参 考 文 献

- [1] Magana M, Pushpanathan M, Santos A L, et al. The value of antimicrobial peptides in the age of resistance [J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2020, 20 (9): e216-e230.
- [2] Fleischmann J, Selsted M E, Lehrer R I. Opsonic activity of MCP-1 and MCP-2, cationic peptides from rabbit alveolar macrophages [J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 1985, 3(3): 233-242.
- [3] Lehrer R I, Daher K, Ganz T, et al. Direct inactivation of viruses by MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics from rabbit leukocytes [J]. *Journal of Virology*, 1985, 54(2): 467-472.
- [4] Fu J, Zong X, Jin M, et al. Mechanisms and regulation of defensins in host defense [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2023, 8: 300.
- [5] Gao X, Ding J, Liao C, et al. Defensins: The natural peptide antibiotic [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2021, 179: 114008.
- [6] Luo Y, Song Y. Mechanism of antimicrobial peptides: Antimicrobial, anti-inflammatory and antibiofilm activities [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(21): 11401.
- [7] Sass V, Schneider T, Wilmes M, et al. Human beta-defensin 3 inhibits cell wall biosynthesis in *Staphylococci* [J]. *Infection and Immunity*, 2010, 78(6): 2793-2800.
- [8] Pardue K R, Beadell B, Ybarra T K, et al. The antimicrobial peptide human beta-defensin 2 inhibits biofilm production of *Pseudomonas aeruginosa* without compromising metabolic activity [J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 805.
- [9] Chairatana P, Nolan E M. Human α -defensin 6: A small

- peptide that self-assembles and protects the host by entangling microbes [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2017, 50(4): 960-967.
- [10] Xia Z, He D, Wu Y, et al. Scorpion venom peptides: Molecular diversity, structural characteristics, and therapeutic use from channelopathies to viral infections and cancers [J]. *Pharmacological Research*, 2023, 197: 106978.
- [11] Conde R, Zamudio F Z, Rodriguez M H, et al. Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom [J]. *FEBS Letters*, 2000, 471(2-3): 165-168.
- [12] Li Z, Wang H, Li S, et al. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* activity of the scorpion-derived peptide GK8 [J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2026, 18(2), 1938-1949.
- [13] Yang X, Zhang H, Zuo Z, et al. Novel structural determinants and bacterial death-related regulatory effects of the scorpion defensin BmKDfsin4 against gram-positive bacteria [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 282: 137151.
- [14] Meng L, Xie Z, Zhang Q, et al. Scorpion potassium channel-blocking defensin highlights a functional link with neurotoxin [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(13): 7097-7106.
- [15] Aliakbari F, Rahmati S, Ghanbari A, et al. Identification and designing an analgesic opioid cyclic peptide from Defensin 4 of *Mesobuthus martensii* Karsch scorpion venom with more effectiveness than morphine [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2025, 188: 118139.
- [16] 尹世金,肖敏,向琪琳,等.多棘蜈蚣钙通道毒素多肽CaTX-Ssmd1原核表达及功能鉴定[J].中南民族大学学报(自然科学版), 2023, 42(3): 313-318.
- [17] Travé - Asensio S, Tort - Miró A, Pinheiro S, et al. Structure-antimicrobial activity relationships of recombinant host defence peptides against drug-resistant bacteria [J]. *Microbial Biotechnology*, 2025, 18(9): e70204.
- [18] Lei J, Sun L, Huang S, et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications [J]. *American Journal of Translational Research*, 2019, 11(7): 3919-3931.
- [19] Kim L. The science of antibiotic discovery [J]. *Cell*, 2020, 181(1): 29-45.
- [20] Patra M, Gupta A K, Kumar D, et al. Antimicrobial resistance: A rising global threat to public health [J]. *Infection and Drug Resistance*, 2025, 18: 5419-5437.
- [21] Dassanayake R P, Porter T J, Samorodnitsky D, et al. Comparative study of antibacterial activity and stability of D-enantiomeric and L-enantiomeric bovine NK-lysin peptide NK2A [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2022, 595: 76-81.
- [22] Awang T, Pongprayoon P. The penetration of human defensin 5 (HD5) through bacterial outer membrane: Simulation studies [J]. *Journal of Molecular Modeling*, 2021, 27(10): 291.
- [23] Silva S G, Pinheiro M, Pereira R, et al. Serine-based surfactants as effective antimicrobial agents against multiresistant bacteria [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2022, 1864(9): 183969.

(责编&校对 姚春娜)