构象锁定松针肽衍生物的设计、合成及抗肿瘤活性研究

梁 锐，吴 也，栾 鑫*

（上海中医药大学交叉科学研究院，上海市中药化学生物学前沿研究基地，上海 201203）

摘要：松针肽（**1**）是一种具有抗肿瘤潜力的天然活性多肽。为提升其结构稳定性与生物活性，该研究基于 **1** 的二级结构特征，结合计算机辅助设计和全碳氢构象锁定策略，成功制备了 2 种构象锁定的 **1** 衍生物，并经 HPLC 和 MS 表征。体外抗增殖试验结果显示，2 种衍生物在受试浓度范围内对黑色素瘤细胞的抑制作用均显著优于 **1**（IC_{50}>32 μmol/L），其中 **1-3** 的活性较佳（对 B16F10 细胞和 A375 细胞的 IC_{50} 为 6.28 和 7.58 μmol/L）。构效关系研究表明，**1-3** 的 α- 螺旋含量较 **1** 提升至 31.4%，抗糜蛋白酶降解的稳定性提高 81 倍，同时保持良好的生物安全性。上述结果表明，构象锁定的 **1-3** 是具有开发潜力的抗黑色素瘤先导化合物，为 **1** 的结构优化提供了新策略。

关键词：松针肽；构象锁定肽；合成；计算机辅助设计；全碳氢构象锁定；黑色素瘤；抗增殖；抗菌肽；抗肿瘤药

中图分类号：R914.5；R978.1^{+}6；R979.1^{+}4　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1001-8255(2025)05-0611-08

引用：梁 锐，吴 也，栾 鑫．构象锁定松针肽衍生物的设计、合成及抗肿瘤活性研究［J］．中国医药工业杂志，2025, 56(5)：611-618．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.05.007

Design, Synthesis, and Antitumor Activity of Stapled Pine Needle Peptide Derivatives

LIANG Rui, WU Ye, LUAN Xin*

(*Shanghai Frontiers Science Center for Chinese Medicine Chemical Biology, Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine Research, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203*)

ABSTRACT: Pine needle peptide (**1**) is a natural bioactive peptide with antineoplastic potential. To enhance its structural stability and bioactivity, two stapled **1** derivatives were successfully designed and synthesized based on the secondary structural characteristics of **1**, utilizing computer aided design and all-hydrocarbon stapling strategy. These derivatives were characterized by HPLC and MS analyses. The results of *in vitro* antiproliferative assays demonstrated that both derivatives exhibited significantly enhanced inhibitory effects against melanoma cells compared with **1** (IC_{50}>32 μmol/L), with the derivative **1-3** showing the highest potency (IC_{50} value 6.28 μmol/L for B16F10 cells and 7.58 μmol/L for A375 cells). Structure-activity relationship analysis revealed that the derivative **1-3** displayed a 31.14% increase in α-helix content and a 81-fold improved stability in chymotrypsin solution compared with **1** while maintaining favorable biosafety. These results indicated that the stapled derivative **1-3** represented a promising lead compound for melanoma treatment, providing a novel strategy for structural optimization of **1**.

Key Words: pine needle peptide; stapled peptide; synthesis; computer aided design; all-hydrocarbon stapling; melanoma; antiproliferation; antimicrobial peptide; antineoplastics

天然 α- 螺旋抗菌肽（antimicrobial peptide，AMP）是一类具有广谱抗菌活性的多肽，其阳离子特性和疏水性残基能够通过静电作用选择性结合带负电荷的细菌膜，从而发挥杀菌作用[1]。由于肿瘤细胞膜表面同样富含磷脂酰丝氨酸等阴离子成分，α- 螺旋 AMP 也能够通过静电与疏水作用，选择性

收稿日期：2025-01-20

基金项目：上海市进一步加快中医药传承创新发展三年行动计划项目［ZY(2025-2027)-2-2-1］

作者简介：梁 锐（1999—），男，硕士研究生，专业方向：中药来源抗肿瘤多肽的结构修饰及作用机制。

通信作者：栾 鑫（1988—），男，研究员，博士生导师，从事临床有效中药来源活性分子的发现及创新应用研究。

E-mail：luanxin@shutcm.edu.cn

结合并裂解肿瘤细胞膜，继而导致肿瘤细胞死亡[2]。相比之下，哺乳动物正常细胞膜表面通常呈电中性，且膜内含有较高比例的胆固醇，这种特性有效降低了阳离子 AMP 对正常细胞的吸附与破坏风险[2]。已有研究[3]表明，与传统抗肿瘤药（如化疗药和靶向治疗药物等）相比，天然 α- 螺旋 AMP 对肿瘤细胞的独特作用机制能够有效克服肿瘤耐药的问题，且 AMP 在裂解肿瘤细胞膜的过程中还能诱导大量抗原物质的释放，从而激活机体的抗肿瘤免疫效应[4]。因此，以天然 α- 螺旋 AMP 为基础开发新型抗肿瘤药具有重要的应用价值和发展潜力。

松针肽（pine needle peptide，**1**）是一种从赤松（*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.）松针中分离得到新型的 AMP。研究[5—6]表明，**1** 对多种革兰阴性菌和阳性菌均有较高的抑菌活性，并在体内展现出显著的抗菌作用。**1** 由 11 个氨基酸残基构成，序列为：FKFLARTGKFL-NH_2，其二级构象呈现出典型的 α- 螺旋构象。在 **1** 的结构中，6 个非极性氨基酸（Phe1、Phe3、Leu4、Ala5、Phe10 和 Leu11）构成了较大面积的疏水网络，而 3 个阳离子氨基酸（Lys2、Arg6 和 Lys9）则形成了亲水区域[6]。这种两亲性分布的空间结构使 **1** 具备潜在的抗肿瘤活性。更重要的是，**1** 对红细胞和巨噬细胞等正常细胞未表现出明显毒性[6]，故基于 **1** 开发抗肿瘤药具有显著的优势和广阔的应用前景。

天然直链多肽在体内往往难以维持螺旋结构，易被蛋白酶降解，从而导致活性丧失，故通过化学修饰增强其结构稳定性是一种的重要合成策略[7]。其中，全碳氢构象锁定策略（all-hydrocarbon peptide stapling strategy）是一种通过引入碳氢支架稳定 α- 螺旋多肽构象的修饰方法。该方法能够显著提升多肽的 α- 螺旋含量、蛋白酶稳定性及生物活性[8]。基于该策略修饰的鼠双微体 2（mouse double minute 2，MDM2）/ 鼠双微体 X（mouse double minute X，MDMX）多肽抑制剂 ALRN-6924 在美国已参与多项临床试验，并在Ⅰ期临床试验（NCT02909972）中展现出较好的安全性和疗效[9]。由于 **1** 的生物活性依赖于 α- 螺旋构象，全碳氢构象锁定策略有望改善其成药性。本研究拟基于计算机辅助设计，筛选出 **1** 的合适修饰位点，随后合成构象锁定的 **1** 衍生物。采用 CCK8 法评价构象锁定的 **1** 衍生物对黑色素瘤细胞 B16F10（鼠源）和 A375（人源）的抗增殖活性，并利用圆二色谱法测试其 α- 螺旋含量，同时通过溶血试验和糜蛋白酶降解试验评估其安全性和蛋白酶稳定性，以期为 **1** 的进一步结构优化和抗肿瘤应用提供数据支持。

1　仪器与试药

Agilent 1260 型 Infinity 高效液相色谱仪、Agilent 6410 型 Triple Quad LC/MS 质谱仪均购于美国安捷伦公司；Waters Auto Purification 型紫外引导自动纯化制备型液相色谱系统（美国 Waters 公司）；Jasco-1700 型圆二色谱仪（日本分光株式会社）；Heracell Vios 160i CR 型细胞培养箱（美国赛默飞世尔科技有限公司）；Cytation™ 5 型细胞成像多功能微孔板检测系统（美国伯腾仪器有限公司）；Scientz-12N 型冷冻干燥机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；250 mL 多肽合成管（上海人贵仪器设备有限公司）。

常规 Fmoc- 氨基酸均购自吉尔生化（上海）有限公司；Fmoc-S_5-OH（上海毕得医药科技股份有限公司，批号 BD224807）；氨基树脂（Rink Amide resin，天津南开和成科技有限公司，基团负载量为 0.31 mmol/g，批号 HCRAm04-1-1）；DCM、DMF、哌啶、2- 肟氰乙酸乙酯（ethyl cyanoglyoxylate-2-oxime，Oxyma Pure®）、*N*,*N*'- 二异丙基碳二亚胺（*N*,*N*'-disopropylcarbodiimide，DIC）、*N*- 甲基 -2- 吡咯烷酮（*N*-methyl-2-pyrrolidone，NMP）、吡啶、乙酸酐、乙腈、二氯乙烷（dichloroethane，DCE）、甲基叔丁基醚、TFA、三异丙基硅烷（triisopropylsilane，TIPS）、Grubbs 催化剂、α- 糜蛋白酶均购自上海泰坦科技股份有限公司；DMEM 培养基、胰酶、青霉素和链霉素（100 IU/mL）、FBS、PBS、CCK8 试剂盒均购自大连美仑生物技术有限公司。

黑色素瘤细胞（鼠源 B16F10 细胞和人源 A375 细胞）和人胚胎肾细胞（HEK293 细胞）均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。人源红细胞购自金少源（上海）生物科技有限公司。

BALB/c 小鼠 2 只，雌性，4 ～ 5 周龄，体质量 18 ～ 22 g，无特定病原体（SPF）级，购自上海普尔 - 必凯实验动物有限公司，实验动物使用许可证编号为 SYXK（沪）2020-0009，

动物实验伦理审查编号为 PZSHUTCM2411220001。

2 方法与结果

2.1 构象锁定 1 衍生物的设计

采用全碳氢构象锁定策略修饰的天然 α-螺旋多肽可能具有溶血毒性风险。本研究采用 MOURTADA 等[10]开发的溶血裂解指数（lyticity index，LI）预测算法，系统评估了在不同位点进行修饰的构象锁定 **1** 衍生物的生物安全性。试验中，LI 值与测得的溶血毒性呈显著正相关性。结果如表 1 显示，含 4 个阳离子电荷的 **1-1**、**1-3**、**1-4** 及 **1-7** 均具有较低的 LI 值。通过整合 **1** 的两亲性分布分析（图 1）及前期构效关系研究[8]，推测将碳氢支架装订在多肽序列的中部有助于显著提高其 α-螺旋含量，且替换 Thr7 之后能够进一步扩大 **1** 的疏水网络，从而增强抗肿瘤活性。基于上述标准，优选 **1-3** 作为目标化合物。为验证算法的可靠性，同步选取 LI 值最高的 **1-2** 作为阳性对照，参与后续研究。

表 1 构象锁定 1 衍生物的设计序列、阳离子数和溶血裂解指数

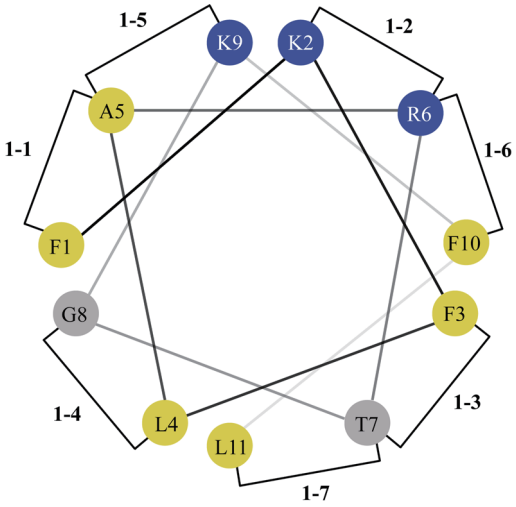
Tab.1 Sequence, Cation Number, and Lyticity Index of the Stapled **1** Derivatives

多肽	序列	阳离子数	LI 值
1	FKFLARTGKFL-NH_2	+4	211.7
1-1	S_5KFLS_5RTGKFL-NH_2	+4	262.1
1-2	FS_5FLAS_5TGKFL-NH_2	+2	422.9
1-3	FKS_5LARS_5GKFL-NH_2	+4	288.1
1-4	FKFS_5ARTS_5KFL-NH_2	+4	289.6
1-5	FKFLS_5RTGS_5FL-NH_2	+3	321.9
1-6	FKFLAS_5TGKS_5L-NH_2	+3	329.7
1-7	FKFLARS_5GKFS_5-NH_2	+4	288.5

2.2 构象锁定 1 衍生物的合成

采用文献[8]报道的方法合成 **1** 及其构象锁定衍生物。

1 粗肽合成：取 0.1 mmol 氨基树脂于多肽合成管中，加入 DCM 6 mL，25 ℃下溶胀 20 min，减压抽滤。加入含 20%哌啶的 DMF 溶液 6 mL，在 35 ℃下振摇反应 5 min，脱除树脂上的 Fmoc 保护基，抽干反应液，重复此步骤 1 次，继续用 DCM 和 DMF 洗涤树脂。随后，取 Fmoc-AA-OH（0.5 mmol）、Oxyma Pure®（0.5 mmol）和 DIC（0.5 mmol）溶于 NMP 6 mL 中，加至树脂中进行偶联反应。普通氨基酸于 60 ℃反应 20 min；Fmoc-S_5-OH 的偶联反应需延长至 2 h。**1** 序列偶联完成后，将树脂加至 TFA 切割试剂（由 95% TFA、2.5%水和 2.5% TIPS 组成）10 mL 中，25 ℃振荡反应 2 h，加入 4 ℃的甲基叔丁基醚 50 mL 沉淀多肽，离心（805×g）5 min，即得 **1** 粗肽。



黄色—疏水性氨基酸；蓝色—碱性氨基酸；灰色—非电离极性氨基酸。

图 1 构象锁定 1 衍生物的螺旋轮投影图

Fig.1 Helical Wheel Diagram of the Stapled **1** Derivatives

1-2 和 **1-3** 粗肽的合成：按上述 **1** 粗肽合成法，完成序列偶联，然后加入含 10 mmol/L Grubbs 催化剂的 DCE 溶液 6 mL，于 35 ℃反应 2 h，反应完毕后再重复 1 次。最后，洗涤树脂，并用与 **1** 粗肽合成法相同的条件进行切割，得到 **1-2** 和 **1-3** 的粗肽。

粗肽经分析型 HPLC 检测确认目标产物后，采用制备型 HPLC 进行纯化，收集主峰组分。随后通过 MS 测定产物的相对分子质量，并再次使用分析型 HPLC 检测纯度。纯化后的主峰组分置 - 80 ℃冰箱中冷冻至固态，再转入预冷的冷冻干燥机中，在 5 ～ 10 Pa 的高真空环境下进行升华以除去水和乙腈，最终获得白色固体产物。纯化后得到 **1**（收率 24.89 %）、**1-2**（收率 15.54 %）和 **1-3**（收率 18.19%）的纯品。

分析型 HPLC 色谱条件：色谱柱 ZORBAX Eclipse XDB C_{18} 柱（4.6 mm×150 mm，3.5 μm）；流动相 A 为 0.1% TFA 水溶液，B 为 0.1% TFA 乙腈溶液，梯度洗脱（0—45 min，B 5%—65%）；检测波长 214 nm；流速 1.0 mL/min；柱温 25 ℃；进样量 100 μL。

制备型 HPLC 色谱条件：色谱柱 XBridge Prep C_{18} 半制备柱（19 mm×250 mm，10 μm）；流动相 A 为 0.1% TFA 水溶液，B 为 0.1% TFA 乙腈溶液，梯度洗脱（0—3 min，B 20%；3—45 min，B 20%—80%）；检测波长 214 nm；流速 15 mL/min；柱温 25 ℃。

质谱条件：离子源电喷雾电离（electrospray ionization，ESI）源；数据采集模式全扫描；检测模式阳离子模式；质量扫描范围 100～1 500；离子源温度 120 ℃；锥孔电压 2 V；毛细管电压 4 000 V；碰撞气氮气；脱溶剂气氮气；脱溶剂气流速 11.0 L/min；温度 299 ℃；碰撞电压 50 V。

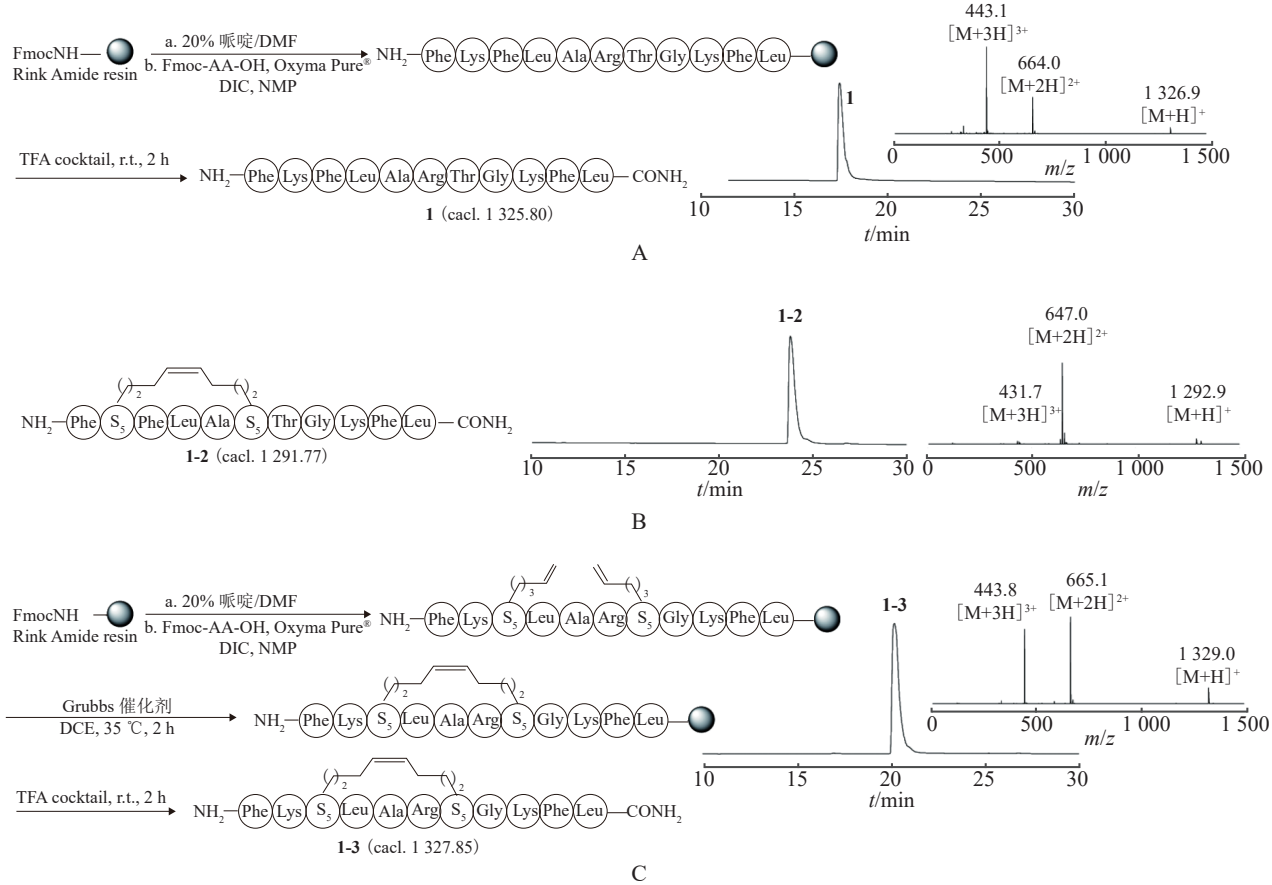
如图 2 所示，测得 **1** 的纯度为 98.91%，MS-ESI（*m/z*）：1 326.9[M+H]$^+$、664.0[M+2H]$^{2+}$、443.1[M+3H]$^{3+}$；**1-2** 的纯度为 98.04%，MS-ESI（*m/z*）：1 292.9[M+H]$^+$、647.0[M+2H]$^{2+}$、431.7[M+3H]$^{3+}$；**1-3** 的纯度为 99.02%，MS-ESI（*m/z*）：1 329.0[M+H]$^+$、665.1[M+2H]$^{2+}$、443.8[M+3H]$^{3+}$。

2.3　构象锁定 **1** 衍生物的二级构象变化

将多肽溶解于水中，配制成终浓度为 100 μmol/L 的待测样品。在 25 ℃下，使用宽度为 1 mm 的石英比色皿收集样品的圆二色谱数据。

圆二色谱仪参数设置：波长 185～250 nm；步长 0.5 nm；带宽 1 nm；扫描速度 10 nm/min。

所得圆二色谱图如图 3 所示。摩尔椭圆率数据



A—**1** 的合成路线及其 HPLC 和 MS 色谱图；B—**1-2**（合成路线同 **1-3**）的结构及其 HPLC 和 MS 色谱图；C—**1-3** 的合成路线及其 HPLC 和 MS 色谱图。

图 2　1 及其构象锁定衍生物的合成路线、HPLC 和 MS 谱图

Fig.2　Synthetic Routes, HPLC Chromatograms, and MS Spectra of **1** and Its Stapled Derivatives

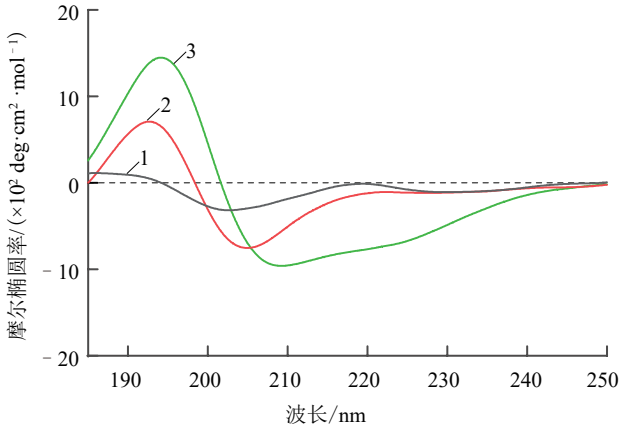
采用标准平滑处理方法。随后根据多肽在 222 nm 处的摩尔椭圆率值，按下式计算多肽的螺旋度（α）。

$$\alpha=(\theta_{222})/(\theta_{max})\times100\%$$

$$\theta_{max}=(-44\,000+250T)\times(1-k/n)$$

式中：θ_{222} 是 222 nm 处的摩尔椭圆率；k=4；n 为多肽中氨基酸的数量 11；T 为 25 ℃。

计算结果表明，经构象锁定后，**1-2** 与 **1-3** 的 α- 螺旋含量较 **1**（0.87%）分别提升至 5.60% 和 31.14%，分别提高了 5.4 倍和 34.8 倍。这一结果表明，全碳氢构象锁定策略能够显著提高 **1** 结构中的 α- 螺旋含量，且将碳氢支架装订在多肽序列的中部有助于显著提高 α- 螺旋的含量。



1—**1**；2—**1-2**；3—**1-3**。

图 3　1 及其构象锁定衍生物的圆二色谱图

Fig.3　Circular Dichroism Spectra of **1** and Its Stapled Derivatives

2.4　构象锁定 **1** 衍生物的抗增殖活性

采用 B16F10（鼠源）和 A375（人源）黑色素瘤细胞模型进行抗肿瘤细胞增殖活性评价，并以 HEK293 细胞作为正常细胞对照。所有细胞均于 37 ℃、5% CO_2 下，在含 10% FBS、1% 青霉素 - 链霉素双抗的 DMEM 培养基中培养。取对数生长期的黑色素瘤细胞或 HEK293 细胞，以每孔 5×10^3 个细胞的密度接种到 96 孔板中，过夜贴壁培养后更换到含梯度浓度（2、4、8、16、32 μmol/L）**1**、**1-2** 或 **1-3** 的新鲜 DMEM 培养基中分别培养，设 3 个复孔及空白对照（仅培养基）组。将多肽和细胞共孵育 24 h 后移除培养上清液，每孔剩余物中加入含 10% CCK8 溶液的无血清培养基，继续孵育 2 h。使用细胞成像多功能微孔板检测系统在 450 nm 处测定光密度（optical density，OD）值，按下式计算细胞存活率（A），并用 GraphPad Prism 8 软件计算多肽的半数抑制浓度（IC_{50}）。

$$A=(OD_{加药}-OD_{对照})/(OD_{空白}-OD_{对照})\times100\%$$

结果如图 4 所示，在受试浓度范围内，**1-2** 与 **1-3** 对 2 株黑色素瘤细胞的抗增殖活性均显著优于 **1**（IC_{50}>32.00 μmol/L）。具体而言，**1-2** 对 B16F10 细胞和 A375 细胞的 IC_{50} 值分别为 32.00 和 14.86 μmol/L；**1-3** 的抑制效果更为显著，IC_{50} 值分别为 6.28 μmol/L（B16F10 细胞）和 7.58 μmol/L（A375 细胞）。与 **1**

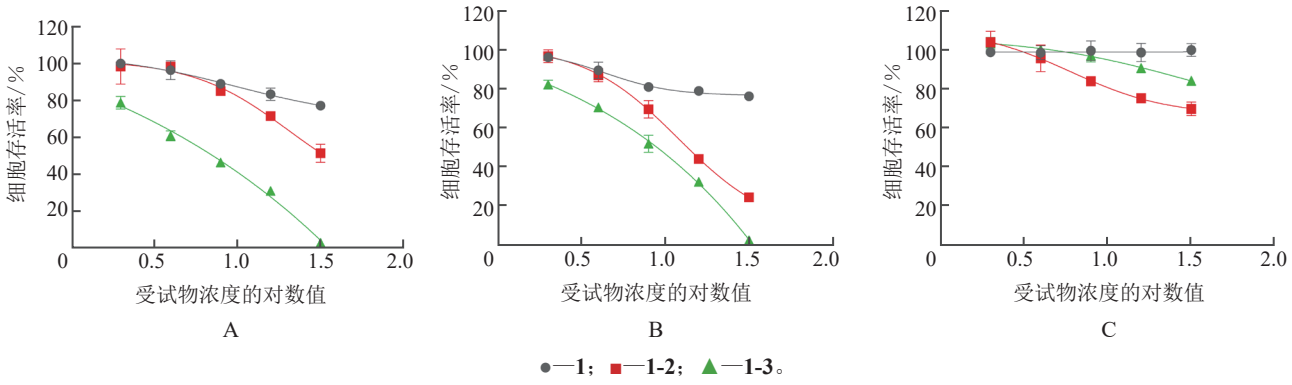


图 4　经 1 或其构象锁定衍生物作用后 B16F10 细胞（A）、A375 细胞（B）和 HEK293 细胞（C）的存活率曲线（n=3）

Fig.4　The Viability Curves of B16F10 Cells (A), A375 Cells (B) and HEK293 Cells (C) after Treatment with **1** or Its Stapled Derivatives (n=3)

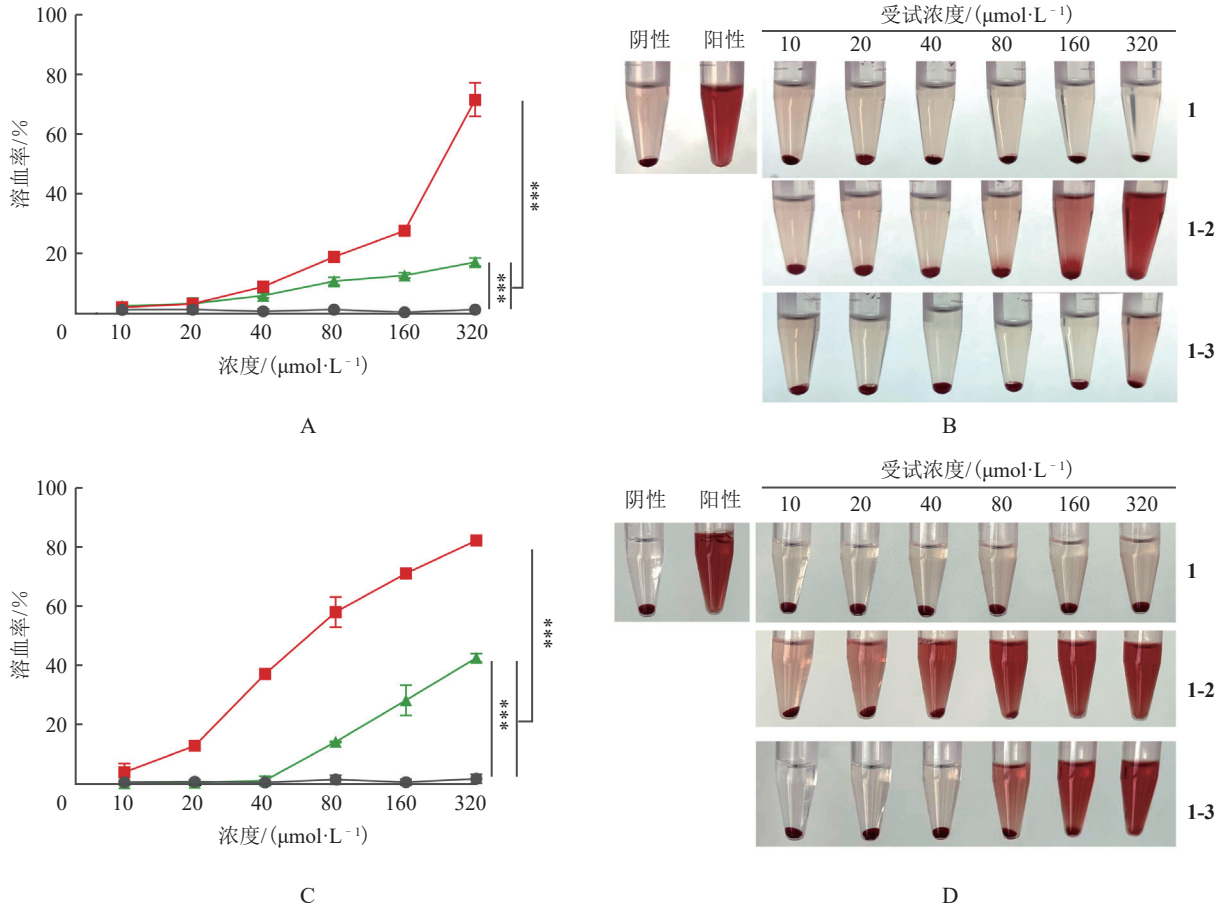
相比，**1-3** 的抗增殖活性提高了 3.2 倍以上。此外，**1-3** 在受试浓度范围内未对 HEK293 细胞表现出显著的抑制作用（IC_{50}>32 μmol/L）。以上结果表明，刚性的螺旋结构及较高的螺旋度有助于增强 **1-3** 的体外抗黑色素瘤细胞活性，且该抑制活性对肿瘤细胞具有特异性。

2.5　构象锁定 **1** 衍生物的溶血性

为评价多肽的生物安全性，采用 BALB/c 小鼠及人源红细胞进行溶血试验。将红细胞悬液（体积分数 4%，用生理盐水配制）以每孔 100 μL 接种于 96 孔板中。分别加入经生理盐水梯度稀释的系列浓度（分别为 10、20、40、80、160、320 μmol/L）**1**、**1-2** 或 **1-3** 溶液，每孔 100 μL，并设置阴性对照（生理盐水）组和阳性对照（0.1% Triton X-100）组，各组设 3 个复孔。37 ℃孵育 1 h 后，室温下离心（201×*g*）10 min。每孔取上清液 100 μL，置新 96 孔板中，使用细胞成像多功能微孔板检测系统在 570 nm 处测定 OD 值。按下式计算溶血率（*H*）。

$$H=(OD_{多肽}-OD_{阴性})/(OD_{阳性}-OD_{阴性})\times100\%$$

将各组上清液与原 96 孔板中的样本收集于 1.5 mL 离心管中，二次离心（453×*g*）后记录溶血现象。结果如图 5 所示。**1** 在受试浓度下未引发显著溶血。**1-2** 表现出剂量依赖性溶血效应，对鼠源和人源红细胞的半数溶血浓度（HC_{50}）为 226.40 和 64.86 μmol/L。值得注意的是，尽管 **1-3** 的溶血率相较 **1** 有所提高，但在其有效抗肿瘤浓度（IC_{50}<



A—**1** 及其构象锁定衍生物的小鼠红细胞溶血率（*** 表示两组间 P<0.001；n=3）；B—**1** 及其构象锁定衍生物的小鼠红细胞溶血代表性图；C—**1** 及其构象锁定衍生物的人源红细胞溶血率（*** 表示两组间 P<0.001；n=3）；D—**1** 及其构象锁定衍生物的人源红细胞溶血代表性图。●—**1**；■—**1-2**；▲—**1-3**。

图 5　1 及其构象锁定衍生物的溶血毒性

Fig.5　Hemolytic Toxicity of **1** and Its Stapled Derivatives

10.00 μmol/L）范围内未观察到明显溶血现象，表明 **1-3** 在肿瘤细胞与正常细胞之间存在较高的选择性。上述结果证实 **1-2** 和 **1-3** 的溶血程度与前期预测模型高度吻合，验证了 WALENSKY 团队算法[11]的有效性。

2.6 构象锁定 1 的蛋白酶稳定性

分别配制 **1** 及其构象锁定衍生物的母液（2 mmol/L，溶剂为 pH 7.4 的 PBS）。将 α- 糜蛋白酶（1 ng/μL）溶于含 2 mmol/L 氯化钙的 PBS（pH 7.4）中。取肽溶液 100 μL 与酶溶液 1 000 μL 于 37 ℃ 恒温孵育，分别于 5、10、15、20、30、60、120、240、360、720 min 时移取反应体系 100 μL，并加入 1 mol/L 盐酸 20 μL 终止反应。通过 HPLC 法测定各时间点样品中多肽的残留百分比。每个试验重复 3 次。

色谱条件：色谱柱 ZORBAX Eclipse XDB C_{18} 柱（4.6 mm×150 mm，3.5 μm）；流动相 A 为 0.1 % TFA 水溶液，B 为 0.1 % TFA 乙腈溶液，梯度洗脱（0—45 min；B 5%—65%）；检测波长 214 nm；流速 1.0 mL/min；柱温 25 ℃；进样量 80 μL。

分别称取 **1**、**1-2** 和 **1-3** 适量，加入 PBS（pH 7.4）溶解并逐步稀释，配制成质量浓度为 0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4 μg/mL 的系列对照品溶液，按上述色谱条件进行测定，以多肽质量浓度（c）为横坐标、峰面积（A）为纵坐标绘制标准曲线，并进行线性回归分析。结果显示，各多肽在相应质量浓度范围内均呈良好的线性关系，**1**、**1-2** 和 **1-3** 的标准曲线方程分别为 A=2 426.6c - 182.09，R^2=0.997 1（**1**）；A=2 550.9c+138.56，R^2=0.998 7（**1-2**）；A=2 427.5c+49.30，R^2=0.999 4（**1-3**）。方法学验证结果显示该法的准确性符合定量分析的要求。

如图 6 所示，天然直链肽 **1** 在糜蛋白酶中的半衰期仅为 4.44 min，而经过构象锁定修饰的 **1-2** 和 **1-3** 则展现出显著增强的酶稳定性。其中，**1-2** 的半衰期提升至 36.57 min；**1-3** 在 360 min 时仍未观察到完全降解，抗糜蛋白酶降解的能力是 **1** 的 81 倍。进一步分析显示，这 3 种肽的酶稳定性与其 α- 螺旋含量呈正相关，提示致密的 α- 螺旋空间结构可通过限制蛋白酶酶切位点的空间可及性，有效提升多肽分子的代谢稳定性。

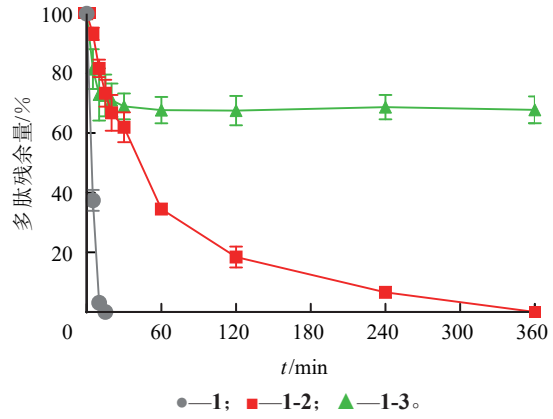


图 6 1 及其构象锁定衍生物的酶降解动力曲线（n=3）

Fig.6 Enzymatic Degradation Kinetic Curves of **1** and Its Stapled Derivatives（n=3）

2.7 构象锁定 1 衍生物的水溶性

采用浊度法评估多肽溶解特性。分别用超纯水配制 **1** 及其构象锁定衍生物的贮备液（32.000 0 mg/mL），取 50 μL 转移至 96 孔板。采用二倍梯度稀释法建立 0.062 5 ～ 32.000 0 mg/mL 的梯度质量浓度，使用细胞成像多功能微孔板检测系统在 600 nm 波长处测定 OD 值（以等体积超纯水作为空白校正），各组设 3 个复孔。

如图 7 所示，与空白组（OD 值为 0.040 ～ 0.045，图中未列出）相比，直链肽 **1** 在 0.062 5 ～ 32.000 0 mg/mL 能稳定溶解；而构象锁定衍生物 **1-2** 和 **1-3** 的 OD 值随质量浓度升高呈梯度递增趋势，表明其水溶性降

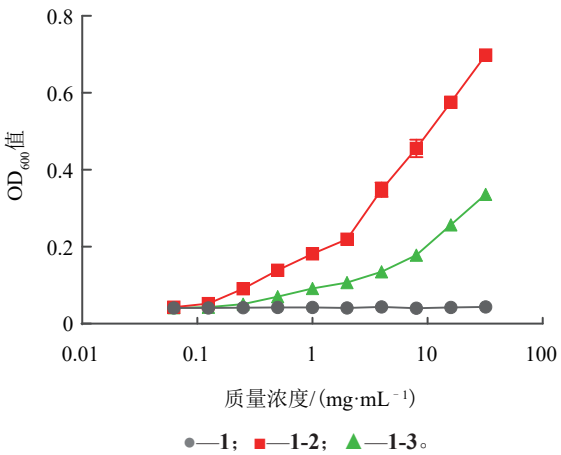


图 7 1 及其构象锁定衍生物的水溶性（n=3）

Fig.7 Water Solubilities of **1** and Its Stapled Derivatives（n=3）

低。此外，**1-2** 的溶解性衰减速率显著高于 **1-3**，证实 **1-3** 在平衡疏水性与溶解性方面更具优势。

3 总结与讨论

现有的天然 α- 螺旋 AMP［如蜂毒肽（melittin）[12] 和蛙皮素（magainin Ⅱ）[13] 等］主要来源于动物 [2]。尽管这些 AMP 表现出广谱的抗肿瘤活性，但其溶血毒性往往较高。此外，较长的氨基酸序列不仅导致合成成本高昂，还增加了结构修饰的复杂性。相比之下，**1** 是一种罕见的植物来源 α- 螺旋 AMP，仅由 11 个氨基酸组成，其螺旋结构呈现出典型的两亲性分布特征：亲水区的 3 个阳离子电荷和 N 端的 1 个阳离子电荷共同赋予其对细菌和肿瘤细胞膜的识别能力，而序列中多个 Phe 和 Leu 残基则构建了强大的疏水网络，使其具备优异的细菌和肿瘤细胞裂解活性。因此，**1** 可作为理想的 α- 螺旋 AMP 模板，用于新型抗菌药与抗肿瘤药的开发。

本课题组前期设计并合成了一系列蜂毒肽的构象锁定衍生物，证实该策略能显著提升蜂毒肽的 α- 螺旋含量、酶稳定性和抗肿瘤活性 [8]。进一步的研究 [14] 系统性地揭示了构象锁定蜂毒肽的构 - 效 - 毒关系，阐明了构象锁定蜂毒肽通过高效裂解肿瘤细胞膜、诱导免疫原性细胞死亡，进而激活机体抗肿瘤免疫的新机制。基于此，本研究结合计算机辅助算法，筛选出具有高治疗指数的构象锁定 **1** 衍生物 **1-3**。这一策略不需要像传统的“staple scan”方法一样合成所有衍生物，显著降低了试验成本、提高了研究效率。结果显示，**1-3** 的 α- 螺旋含量、抗黑色素瘤细胞增殖活性及抗糜蛋白酶的稳定性均得到显著提高，同时在有效抗肿瘤浓度下安全性良好。这些特点使 **1-3** 成为抗黑色素瘤药物的潜在先导化合物，为后续优化与开发提供了重要依据。

参考文献：

［1］ GAN B H, GAYNORD J, ROWE S M, *et al*. The multifaceted nature of antimicrobial peptides: current synthetic chemistry approaches and future directions［J］. *Chem Soc Rev*, 2021, **50**(13): 7820-7880.

［2］ LUAN X, WU Y, SHEN Y W, *et al*. Cytotoxic and antitumor peptides as novel chemotherapeutics［J］. *Nat Prod Rep*, 2021, **38**(1): 7-17.

［3］ LUO X F, WU Y, ZHANG X K, *et al*. Peptide-based strategies for overcoming multidrug-resistance in cancer therapy［J］. *Chin Chem Lett*, 2025, **36**(1): 109724.

［4］ ZHANG X K, WU Y, LIN J Y, *et al*. Insights into therapeutic peptides in the cancer-immunity cycle: update and challenges［J］. *Acta Pharm Sin B*, 2024, **14**(9): 3818-3833.

［5］ LEE J, KANG H K, CHEONG H, *et al*. A novel antimicrobial peptides from pine needles of *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc. against foodborne bacteria［J］. *Front Microbiol*, 2021, **12**: 662462.

［6］ KANG D D, PAKR J, PARK Y. Therapeutic potential of antimicrobial peptide PN5 against multidrug-resistant *E. coli* and anti-inflammatory activity in a septic mouse model［J］. *Microbiol Spectr*, 2022, **10**(5): e0149422.

［7］ LUONG H X, BUI H T P, TUNG T T. Application of the all-hydrocarbon stapling technique in the design of membrane-active peptides［J］. *J Med Chem*, 2022, **65**(4): 3026-3045.

［8］ WU Y, LU D, JIANG Y X, *et al*. Stapled wasp venom-derived oncolytic peptides with side chains induce rapid membrane lysis and prolonged immune responses in melanoma［J］. *J Med Chem*, 2021, **64**(9): 5802-5815.

［9］ GUERLAVAIS V, SAWYER T K, CARVAJAL L, *et al*. Discovery of sulanemadlin (ALRN-6924), the first cell-permeating, stabilized α-helical peptide in clinical development［J］. *J Med Chem*, 2023, **66**(14): 9401-9417.

［10］ MOURTADA R, HERCE H D, YIN D J, *et al*. Design of stapled antimicrobial peptides that are stable, nontoxic and kill antibiotic-resistant bacteria in mice［J］. *Nat Biotechnol*, 2019, **37**(10): 1186-1197.

［11］ WALENSKY L D, BIRD G H. Hydrocarbon-stapled peptides: principles, practice, and progress［J］. *J Med Chem*, 2014, **57**(15): 6275-6288.

［12］ ULMSCHNEIDER J P, ULMSCHNEIDER M B. Melittin can permeabilize membranes via large transient pores［J］. *Nat Commun*, 2024, **15**(1): 7281.

［13］ BEHZADI M, ARASTEH S, BAGHERI M. Palmitoylation of membrane-penetrating magainin derivatives reinforces necroptosis in A549 cells dependent on peptide conformational propensities［J］. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, **12**(51): 56815-56829.

［14］ LU L, ZHANG H, ZHOU Y D, *et al*. Polymer chimera of stapled oncolytic peptide coupled with anti-PD-L1 peptide boosts immunotherapy of colorectal cancer［J］. *Theranostics*, 2022, **12**(7): 3456-3473.