

多肽突变体 Cbf-14-2 抗青霉素耐药细菌的活性研究

汪梦筱, 马菱蔓, 刘含含, 蒋美玲, 窦洁, 周长林*

(中国药科大学微生物学教研室,南京 210009)

摘要 本研究主要探讨了新型多肽突变体 Cbf-14-2 对携带 NDM-1 基因重组菌 (*E. coli* BL21 (DE3)-NDM-1) 的抗菌活性及机制。实验采用肉汤倍比稀释活菌计数法测定多肽对 *E. coli* BL21 (DE3)-NDM-1 重组菌的 MIC/MBC 和杀菌曲线, 评价多肽的体外抗菌活性; 采用重组菌腹腔感染法建立小鼠败血症模型, 评价多肽的体内抗菌活性; 通过 Zeta 电位分析和流式细胞术探讨 Cbf-14-2 抗耐药细菌感染的作用机制。结果表明, 多肽 Cbf-14-2 对携带 NDM-1 基因的耐药细菌具有良好的抗菌活性 (MIC = 16 μg/mL), 能在 2 h 内快速杀灭细菌; 同时, 多肽能显著降低感染小鼠肝、脾、肺和肾脏等组织的细菌负载量, 对细菌显示出强效清除能力, 将小鼠存活率由 10% 提高至 70%。这主要由于 Cbf-14-2 能与细菌细胞膜表面负电荷发生静电结合, 增加对膜的穿透能力。因此, Cbf-14-2 有望成为治疗 NDM-1 耐药细菌诱发感染的潜在抗菌剂。

关键词 抗菌肽; Cbf-14-2; 抗菌活性; NDM-1

中图分类号 R96 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2017)04-0496-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170416

引用本文 汪梦筱, 马菱蔓, 刘含含, 等. 多肽突变体 Cbf-14-2 抗青霉素耐药细菌的活性研究 [J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(4):496–502.
 Cite this article as: WANG Mengxiao, MA Lingman, LIU Hanhan, et al. Effective antimicrobial activity of Cbf-14-2 against penicillin-resistant bacteria *in vitro* and *in vivo* [J]. *J China Pharm Univ*, 2017, 48(4):496–502.

Effective antimicrobial activity of Cbf-14-2 against penicillin-resistant bacteria *in vitro* and *in vivo*

WANG Mengxiao, MA Lingman, LIU Hanhan, JIANG Meiling, DOU Jie, ZHOU Changlin*

Department of Microbiology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract The antibacterial activity and mechanism of the antimicrobial peptide mutant Cbf-14-2 against NDM-1 carrying recombinant bacteria (*E. coli* BL21 (DE3)-NDM-1) was investigated in this study. The minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and killing curves (KCs) *in vitro* were determined by the broth microdilution method. Mice septicemia model was established by interaperitoneal injection of *E. coli* BL21 (DE3)-NDM-1 to evaluate the antibacterial activity of this peptide *in vivo*. Results showed that Cbf-14-2 exhibited a potent antibacterial activity with MIC of 16 μg/mL and killed almost all recombinant bacteria within 120 min. Meanwhile, it significantly improved the survival rate of infected mice up to 70% with the decreasing of bacterial load in mice lung, liver, spleen and kidney. This powerful clearance ability of Cbf-14-2 against bacteria mainly related to its enhanced membrane penetration ability through neutralizing the negative charges and disrupting the integrity of the bacterial cell membrane. Therefore, Cbf-14-2 is expected to be a potential antimicrobial agent for the treatment of infection induced by multi-drug resistant bacteria, especially for the NDM-1 carrying bacteria.

Key words antimicrobial peptide; Cbf-14-2; antimicrobial activity; NDM-1

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81673483); the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 2632017PT03) and the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PADA).

收稿日期 2017-02-20 *通信作者 Tel:025-83271323 E-mail:cl_zhou@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 81673483); 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (No. 2632017PT03); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PADA)

2008年,研究人员发现第一例产新德里金属 β -内酰胺酶(New Delhi metallo- β -lactamase, NDM-1)的肺炎克雷伯耐药菌,与之前的金属 β -内酰胺酶相比,新德里金属 β -内酰胺酶的基因序列同源性低于33%,且能与碳青霉烯类药物更好地结合^[1-2]从而产生对碳青霉烯类药物的耐药,引起了世界范围内的恐慌^[3]。目前临幊上主要使用多黏菌素和替加环素对NDM-1超级细菌引发的感染进行治疗,但多黏菌素较大的肾脏、神经系统毒性及细菌对替加环素逐渐下降的敏感性^[4-5],导致产NDM-1的耐药菌呈全球播散的趋势,严重威胁人类健康。因此,为挽救这一严峻形式,寻求新的抗菌药物已迫在眉睫。

抗菌肽因其良好的抗菌活性和广泛的抗菌谱,目前已成为继抗生素之后最具潜力的抗耐药细菌感染新药^[6]。BF-30是由金环蛇Cathelicidin基因编码的一种含有30个氨基酸残基、N端有两亲性 α -螺旋的直链天然多肽^[7],其具有抗菌活性强、广谱性好且溶血性低等优点^[8]。针对限制多肽类药物发展的成本问题及对细菌细胞膜的穿透能力,前期研究在BF-30的基础上,截取了其中10个氨基酸片段并在其N末端拼接高度 α -螺旋化的RLLR序列,得到具有良好抗耐药细菌活性的多肽Cbf-14^[9]。但Cbf-14血清稳定性差,因此进一步将Cbf-14序列中的第5、9位赖氨酸突变为非天然鸟氨酸获取新型多肽突变体——Cbf-14-2,并评价Cbf-14-2对携带NDM-1基因的E. coli BL21(DE3)-NDM-1重组菌的体内/外药效及可能的作用机制,以期得到稳定性好、活性高、毒性低的新型抗耐药细菌感染小分子多肽类药物。

1 材料

1.1 菌种和菌种的活化及培养

参照文献方法^[10]构建E. coli BL21(DE3)-NDM-1重组菌,即登陆PubMed,在Genbank数据库中搜索Klebsiella pneumoniae的ndm-1全基因序列(accession no. HQ328085),基因两端添加酶切位点BamH I和EcoR I,交由生工生物工程有限公司合成,连接于pET28a载体后,转入宿主菌——E. coli BL21(DE3)而得到。

将冻存于-20℃的E. coli BL21(DE3)-NDM-1重组菌从甘油管转接至LB琼脂斜面上,37℃恒温

培养24 h后,挑取少许菌体转接至含有卡那霉素(终浓度为50 μg/mL)的LB液体培养基中,37℃培养箱或摇床中培养8~12 h,实验前4 h加入终浓度为1.0 mmol/L的IPTG诱导重组菌NDM-1酶的表达。

1.2 药品及试剂

多肽Cbf-14-2(氨基酸序列:RLLR-Orn-FFR-Orn-LKKSV-NH2)由吉尔生化(上海)有限公司合成,纯度≥98%;替加环素、青霉素钠、卡那霉素(上海生工股份有限公司)。

1.3 动物

ICR小鼠,雄性,共90只,购自扬州大学比较医学中心。所涉及的动物实验均依照江苏省实验动物管理办法(SYXK 2012-0035)进行操作。

1.4 仪器

Bio-Rad iMark酶标仪、BD FACS Calibur流式细胞仪、BI-DNDC纳米粒径仪(美国Brookhaven公司)。

2 方法

2.1 最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)的测定^[11-12]

采用微量液体培养基稀释法测定多肽Cbf-14-2对实验用菌的MIC。受试药物用MH液体培养基倍比稀释成不同的浓度梯度后,分别取100 μL于96孔板中,之后等体积接种经培养基稀释至1×10⁵ CFU/mL的菌悬液,使药物终浓度分别为512,256,128,64,32,16,8,4,2,1,0.5 μg/mL,同时设置不加药物的空白对照组。将96孔板置于37℃恒温培养约18 h,观察并记录实验结果。以不长菌的最低药物浓度为MIC。

取上述MIC测定中未见菌落生长的培养物100 μL,加入无菌培养基900 μL稀释后,转移至无菌平皿中,加入含卡那霉素的琼脂培养基(温度55~56℃,卡那霉素终浓度为50 μg/mL)约10.0 mL,37℃培养24 h,观察并记录平皿中的菌落数,菌落数小于5个的最低药物浓度即为MBC。

2.2 杀菌曲线的测定^[13]

取4支灭菌试管,每支试管中加入新鲜菌悬液(细菌浓度约10⁵ CFU/mL)5.0 mL。然后取625 μL多肽Cbf-14、多肽Cbf-14-2、替加环素及PBS溶液分别加入4支试管中,使各受试药物的终浓度均为4×MIC,混匀后置于37℃培养箱中培

养,分别于培养后 0, 10, 30, 60, 120, 240, 360, 480 min 定时取出混合培养物 200 μL, 梯度稀释后, 取 1.0 mL 于无菌平皿中, 加入含卡那霉素的琼脂培养基(温度 55~56 °C, 卡那霉素终浓度为 50 μg/mL)约 10.0 mL, 37 °C 恒温培养 16~18 h, 观察并记录平皿中的菌落数, 以药物作用时间为横坐标, 菌落对数值为纵坐标, 绘制杀菌曲线。

2.3 *E. coli* BL21 (DE3)-NDM-1 重组菌感染小鼠模型的确证^[14]

取健康 ICR 小鼠, 20~22 g, 随机分为 6 组, 每组 15 只。其中 5 组小鼠腹腔接种 MLD 浓度的细菌悬液(1×10^{10} CFU/mL; 0.5 mL/只)进行感染, 建立菌血症模型; 另设等体积生理盐水腹腔注射小鼠为正常对照组。所有小鼠分别于感染前及感染后 2, 4, 6, 8, 10 h 静脉注射 IPTG(1.8 g/kg)诱导重组菌 NDM-1 酶的表达^[9]。其中, 感染组小鼠分别给予 10 mg/kg Cbf-14-2(高剂量组)、5.0 mg/kg Cbf-14-2(中剂量组)、2.5 mg/kg Cbf-14-2(低剂量组)、8.0 mg/kg 替加环素(阳性对照组)、等体积生理盐水(模型对照)。多肽给药组和生理盐水组分别于感染后 0.5, 2 h 腹腔给药两次, 替加环素组在感染后 2 h 尾静脉给药 1 次。每天观察各组小鼠的存活情况和体重变化, 并记录, 连续观察 7 d。

细菌感染后 24 h, 每组取 5 只小鼠, 处死。无菌条件下收集小鼠的肝、肺、脾、肾组织, 用无菌纱布吸干表面血渍后称重, 置于无菌 EP 管中, 加入 9 倍体积的生理盐水, 电动匀浆仪制备匀浆液备用。取部分肺组织匀浆液, 分别以 $\times 2$, $\times 5$, $\times 10$ 倍进行稀释, 然后分别取 400 μL 均匀涂布于含有卡那霉素的琼脂固体培养基上(每个稀释度的匀浆液均涂布 3 个平板), 将平板微敞开, 使多余液体风干; 贴入含药纸片, 其中左侧纸片含美罗培南(0.1 μg), 右侧纸片含美罗培南(0.1 μg) + EDTA(0.5 mol/L, 10 μL)。将平板置于 37 °C 恒温培养箱中倒置培养, 次日观察平板上抑菌圈的大小。

2.4 多肽 Cbf-14-2 对 *E. coli* BL21 (DE3)-NDM-1 重组菌感染小鼠的保护作用

分别取上述步骤中制备的小鼠肝、肺、脾、肾组织匀浆液, 以 $\times 2$, $\times 5$, $\times 10$, $\times 15$ 倍进行稀释, 得到不同浓度梯度的组织匀浆稀释液。分别取各稀释液 1.0 mL 加入无菌平板中, 加入含卡那霉素的琼脂培养基约 10.0 mL, 充分混匀, 37 °C 恒温培养。

18~24 h 后, 观察平板上的菌落数。每个稀释梯度均有 3 个平行对照, 最后以平均值表示各组小鼠组织匀浆液中细菌的存活数量。同时, 取各组小鼠的肺、脾、肾匀浆液进行革兰染色, 油镜下观察各组小鼠脏器中细菌数量。

2.5 多肽 Cbf-14-2 对细菌细胞膜的 Zeta 电位变化及膜穿透能力的影响^[15]

实验将不同浓度的多肽 Cbf-14-2(终浓度分别为 $1/4 \times \text{MIC}$, $1 \times \text{MIC}$, $4 \times \text{MIC}$)分别与 *E. coli* BL21 (DE3)-NDM-1 重组菌(浓度为 3×10^7 CFU/mL)在 37 °C 环境下共孵育 30 min, 另设等体积 PBS 处理组作为空白对照组。离心, 收集菌体, ddH₂O 重悬, 25 °C 条件下采用 Zeta 电位分析仪测定细菌细胞膜表面的电位变化情况, 分析多肽与细菌表面的静电结合作用。同时, 收集的部分菌体采用 PBS 重悬, 加入 PI 荧光染料, 流式细胞术检测多肽 Cbf-14-2 对细菌细胞膜完整性的破膜情况。

2.6 统计学分析

所有实验数据均采用 IBM SPSS 20 软件进行分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示。两组均值比较采用 *t* 检验, 多组之间比较采用 One-Way ANOVA 中的 Dunnett's 分析。 $P < 0.05$ 为显著差异; $P < 0.01$ 为极显著差异。

3 结 果

3.1 多肽 Cbf-14-2 对 *E. coli* BL21 (DE3)-NDM-1 重组菌的 MIC 和 MBC

微量稀释法测定抗菌肽 Cbf-14-2 对实验用菌的 MIC 值, 结果显示, 在 IPTG 诱导条件下, 重组菌具有高表达 NDM-1 酶活的能力^[10], 所以对青霉素产生耐药性($\text{MIC} > 512 \mu\text{g/mL}$), 而多肽 Cbf-14-2 对 NDM-1 酶表达或不表达的重组菌的 MIC 和 MBC 值均分别为 16 μg/mL 和 32 μg/mL。提示: 多肽 Cbf-14-2 对 *E. coli* BL21 (DE3)-NDM-1 重组菌具有良好的抗菌活性, 如表 1 所示。

3.2 多肽 Cbf-14-2 对 *E. coli* BL21 (DE3)-NDM-1 重组菌的杀菌曲线

测定多肽 Cbf-14-2 或替加环素对 IPTG 诱导或不诱导处理的 *E. coli* BL21 (DE3)-NDM-1 重组菌的杀灭能力。从图 1 可以看出, Cbf-14-2 在 $4 \times \text{MIC}$ 浓度下, 对重组菌具有良好的杀灭能力, 能够在 2 h 内快速杀灭所有实验菌株; 表明该多肽对携带 NDM-1

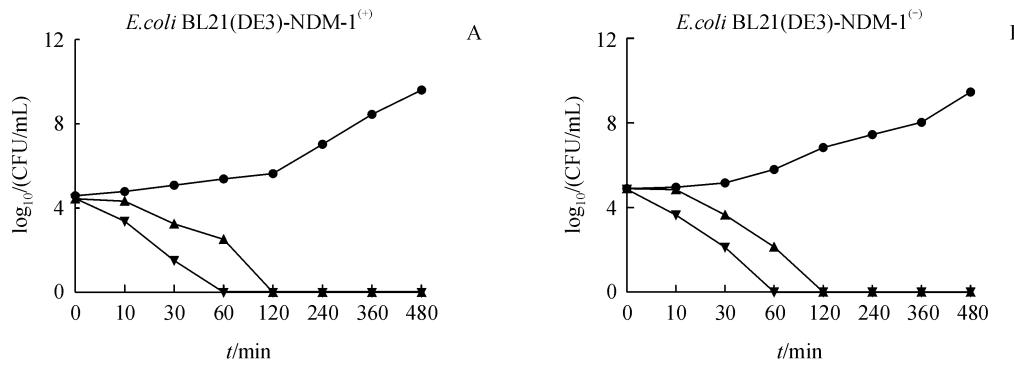
耐药基因的大肠埃希菌具有高效的杀菌效果。

Table 1 Antimicrobial activity of Cbf-14-2 *in vitro*

Bacterial strain	MIC/($\mu\text{g}/\text{mL}$)			MBC/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	Cbf-14-2	Tigecycline	Penicillin	Cbf-14-2	Tigecycline
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)-NDM-1 ⁺	16	1	>512	32	2
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)-NDM-1 ⁻	16	1	8	32	2

(+) NDM-1 carrying *E. coli* BL21 (DE3) with IPTG (1.0 mmol/L) induction for 4 h

(-) NDM-1 carrying *E. coli* BL21 (DE3) without IPTG induction



—◆—Control;—▲—Cbf-14-2 ($4 \times \text{MIC}$);—▼—Tigecycline ($4 \times \text{MIC}$)

Figure 1 Time kill curves of Cbf-14-2 against NDM-1-carrying *Escherichia coli* in the presence (A) or absence (B) of IPTG induction. $4 \times \text{MIC}$ of peptide or Tigecycline was used for each group, while the control group contained no peptide or tigecycline

3.3 *E. coli* BL21 (DE3)-NDM-1 重组菌感染小鼠模型的确定

本研究根据文献报道方法^[9],采用外源IPTG诱导感染小鼠体内重组菌NDM-1的表达,建立*E. coli* BL21 (DE3)-NDM-1 重组菌感染的小鼠模型,并采用纸片扩散法对NDM-1的表达进行验证。结果显示,IPTG诱导的感染小鼠肺组织匀浆液中检测到NDM-1的高表达,主要表现为:模型组小鼠的肺组织匀浆液涂布平板后,在含有EDTA的美罗培南纸片周围观察到了明显的抑菌圈(图2)。这是由于NDM-1为金属酶,其锌离子可与金属离子螯合剂EDTA结合,使酶丧失活性,导致携带NDM-1耐药基因的细菌又重新获得对美罗培南的药敏性,从而显示出抑菌圈。通过验证,表明本研究成功建立了*E. coli* BL21 (DE3)-NDM-1 重组菌感染的小鼠模型,可用于后续研究。采用Cbf-14-2治疗后,随着多肽浓度的增加,在含有EDTA的美罗培南纸片周围抑菌圈直径逐渐减小,表明该多肽对小鼠体内重组菌NDM-1的表达具有良好的抑制效果。

3.4 多肽 Cbf-14-2 对 *E. coli* BL21 (DE3)-NDM-1 重组菌感染小鼠的保护作用

多肽的体内抗菌活性主要采用重组菌感染小鼠的生存率、组织菌落计数和革兰染色进行评价。

如图3所示,多肽Cbf-14-2(2.5,5,10 mg/kg)治疗后,细菌感染小鼠的生存率由10%分别提高至40%、50%和70%。组织活菌计数的结果(图3B-E)也显示,高存活率组小鼠的组织(肝、肺、脾、肾)活菌负载量明显降低,并且给药后各组小鼠脏器中的菌落数与模型组比较都有明显的下降趋势。

同时,取小鼠肺、脾、肾的组织匀浆液进行革兰染色,油镜下观察发现(图4),与模型组相比,Cbf-14-2治疗组细菌量明显减少,且呈剂量依赖性变化。以上结果表明,多肽Cbf-14-2表现出强烈的细菌清除力。

3.5 多肽 Cbf-14-2 对 *E. coli* BL21 (DE3)-NDM-1 重组菌细胞膜的影响

Zeta电位检测结果显示Cbf-14-2与大肠杆菌细胞膜之间存在静电结合。如图5(A)所示,重组菌自身膜电位为-51.05 mV,当分别与1/4×MIC,1×MIC,4×MIC浓度的多肽共孵育30 min后,重组菌表面膜电位依次提高到-37.19,-31.8,-28.85 mV,该数据表明多肽Cbf-14-2能有效地中和革兰阴性细菌表面的负电荷。

此外,膜穿透能力是评价多肽抗菌活性的一个重要指标。如图5-B所示,流式细胞术检测发现该多肽对*E. coli* BL21 (DE3)-NDM-1 重组菌具有良

好的膜穿透效果,从剂量为 $1/4 \times \text{MIC}$ 开始,图中峰形发生明显右移,当多肽剂量增大到 $1 \times \text{MIC}$ 时,图中峰形右移最明显。说明细菌细胞的PI阳性率随着Cbf-14-2剂量的增大而升高,当多肽剂量

达到 $1 \times \text{MIC}$ 时,PI阳性率最高,死亡的细菌细胞最多。以上数据不仅表明多肽Cbf-14-2能够有效破坏细菌细胞膜的完整性,造成细菌死亡,并且这种膜破坏能力具有剂量依赖性的特点。

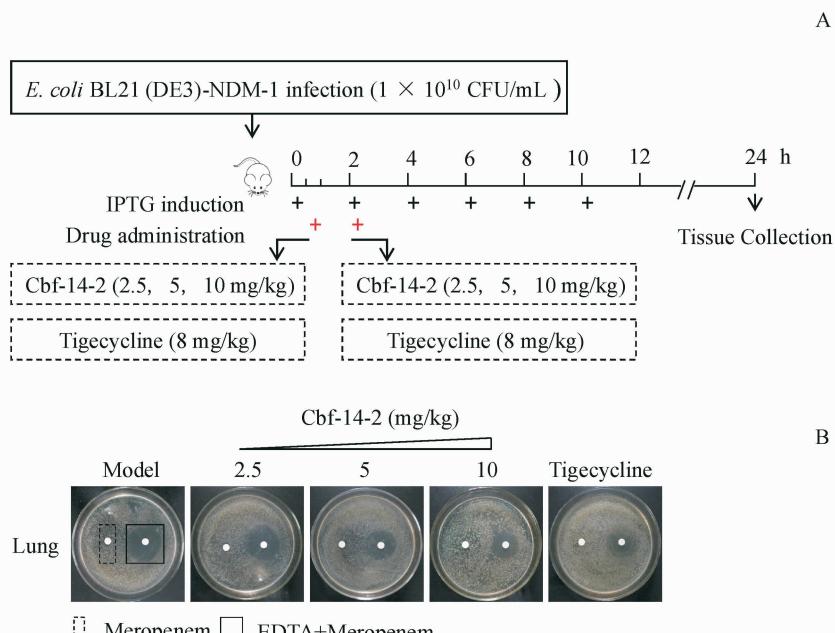


Figure 2 NDM-1 expression in the *E. coli* BL21 (DE3)-NDM-1 infected mice model. (A) The infection, induction and treatment approach of antimicrobial activity study of Cbf-14-2 *in vivo*, n = 15. (B) The production of metallo-beta-lactamase (NDM-1) was tested using the disc diffusion assay method. The study was conducted in triplicate, and data from one representative experiment were shown

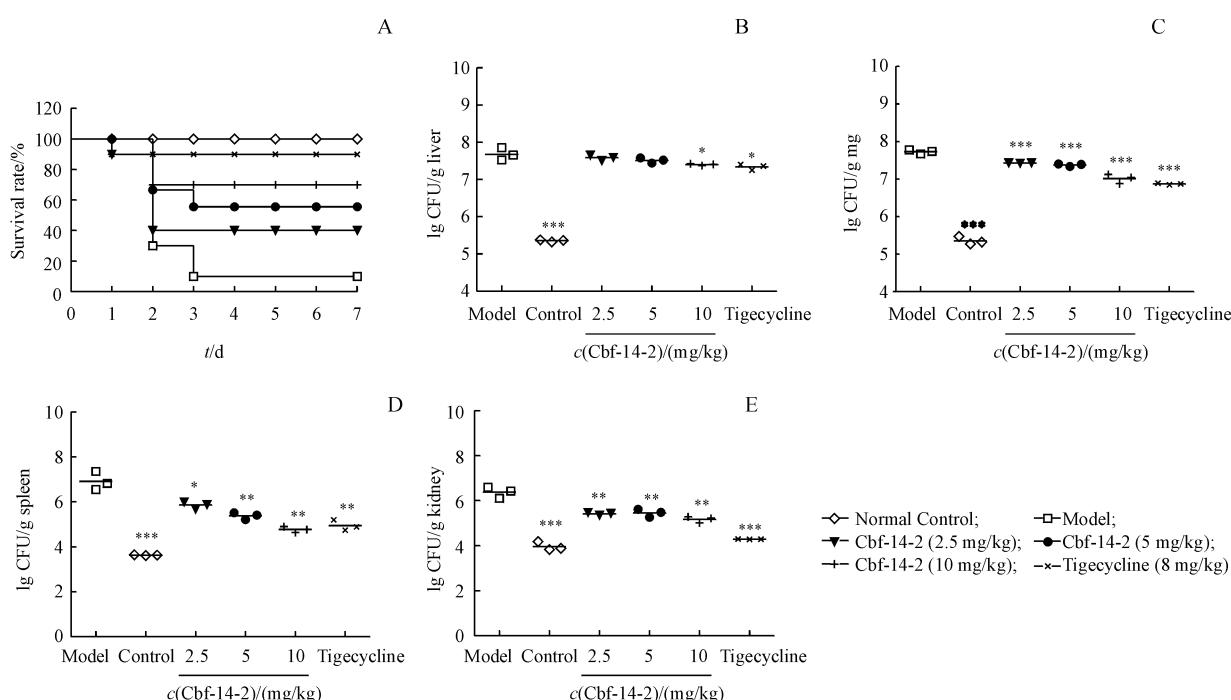


Figure 3 Antibacterial activity of Cbf-14-2 in *E. coli* BL21 (DE3)-NDM-1-infected mice. (A) Survival plot of mice inoculated via an intraperitoneal injection with NDM-1-carrying *E. coli* (1×10^{10} CFU/mL) with repeated IPTG induction. Colonization of *E. coli* BL21 (DE3)-NDM-1 inoculum in the liver (B), lung (C), spleen (D) and kidney (E) of infected mice induced with IPTG

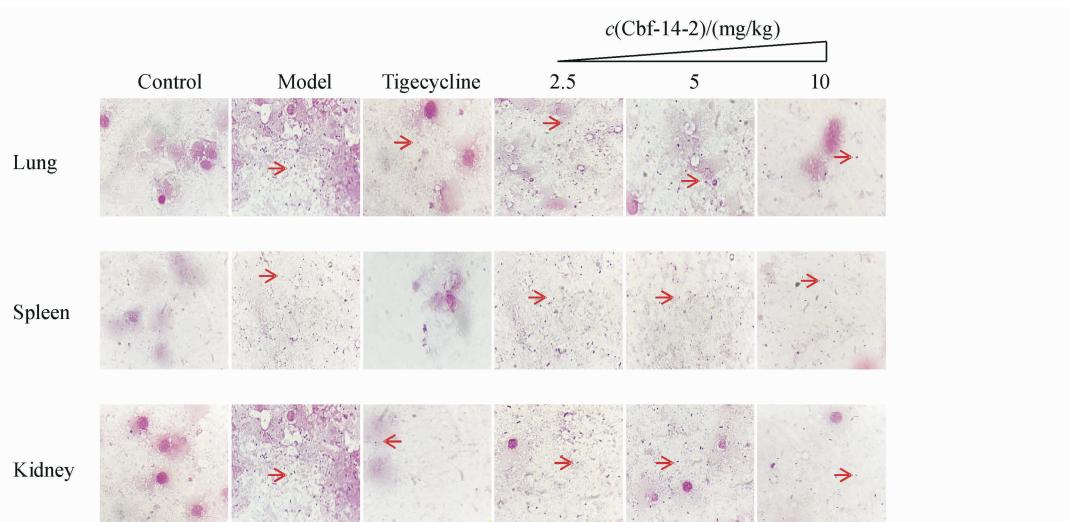


Figure 4 Gram staining of homogenized lung, spleen and kidney. Arrows point to dyed bacterium ($\times 100$)

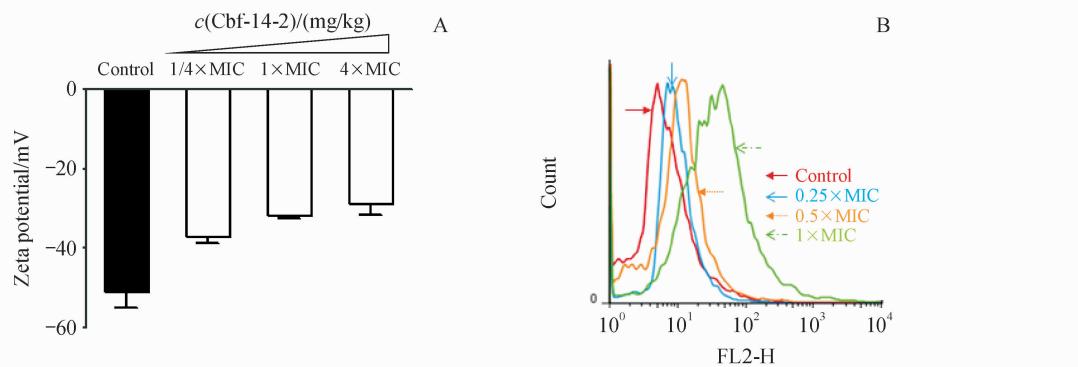


Figure 5 Cbf-14-2 induced membrane-disruption effects against bacteria

(A) The Zeta-potential of *E. coli* BL21 (DE3)-NDM-1 treated with 0.25, 1 and 4 \times MIC peptide, respectively. Bars represented the standard deviation from three independent experiments, each one with 15 measurements. (B) Flow cytometry assay of Cbf-14-2 disrupting the cell membrane of NDM-1-carrying *Escherichia coli* using PI staining

4 讨 论

自抗生素问世以来,细菌的耐药性就变成了一个越来越严重的问题。携带新型金属 β -内酰胺酶NDM-1的超级耐药细菌不仅能够水解碳青霉烯类的抗生素,且活性不受克拉维酸等 β -内酰胺酶抑制剂的影响^[16]。产NDM-1的肺炎克雷伯菌中编码NDM-1酶的基因blaNDM-1位于一个180 kb的质粒上,在blaNDM-1基因片段上游的2个区域中还存在能够抵抗红霉素、链霉素、氯霉素等抗生素和磺胺药物以及消毒剂的多种耐药基因。

通过本文研究发现多肽Cbf-14-2在体内/对外携带NDM-1基因的耐药细菌具有良好的抗菌活性,MIC为16 $\mu\text{g}/\text{mL}$,能在2 h内快速杀灭耐药细菌。经重组菌腹腔感染的小鼠,采用Cbf-14-2治疗

后,存活率由10%提高至70%;同时,治疗组小鼠的肝、肺、脾、肾组织中细菌负载量明显下降,与模型组比较具有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。组织匀浆液的革兰染色结果也进一步证明,多肽Cbf-14-2对耐药细菌具有高效的清除能力。由于Cbf-14-2在结构上保留了母肽——Cbf-14氨基酸序列中具有高度 α 螺旋性的RLLR序列,因此具有较好的两亲性。本课题组前期研究证实,与Cbf-14相比,将赖氨酸突变为鸟氨酸后,Cbf-14-2的抗菌活性有了较好的提升,这主要是由于Cbf-14-2在细菌细胞膜模拟环境中 α 螺旋度明显提高(50 mmol/L LPS溶液,13.9% vs 83.9%)。据报道,多肽的结构与活性之间存在密切关系,氨基酸组成、净电荷、疏水性和两亲性均能影响多肽的抗菌活性^[17]。 α -螺旋抗菌肽,其亲水基团沿极性一

侧对齐,疏水基团向相反一侧对齐,形成亲水面和疏水面,从而有利于多肽疏水面与细菌表面结合,引起细菌细胞膜破裂^[18]。虽然多肽的抗菌活性随 α 螺旋度的增加而升高,但多肽毒性也随之升高。而在本研究中,Cbf-14-2 对绵羊红细胞的溶血活性相较 Cbf-14 降低,且在 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量时对小鼠脾细胞的毒性也降低,说明该多肽对生物膜作用具有选择性,其对哺乳动物细胞毒性低。多肽 Cbf-14-2 作为一种阳离子抗菌肽,其作用机制主要是通过静电结合力,中和细菌细胞膜表面的负电荷,提高膜渗透性,破坏膜完整性,从而杀死细菌。哺乳动物细胞表面由于不带电荷,所以不易受到抗菌肽的影响。因此,Cbf-14-2 可作为一种潜在的抗菌制剂进行进一步的研发。

参考文献

- [1] Molton JS, Tambyah PA, Ang BS, et al. The global spread of healthcare-associated multidrug-resistant bacteria: a perspective from Asia [J]. *Clin Infect Dis*, 2013, **56**(9): 1310–1318.
- [2] Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, et al. The emerging NDM carbapenemases [J]. *Trends Microbiol*, 2011, **19**(12): 588–595.
- [3] Doret L, Nordmann P, Poirel L. Association of the emerging carbapenemase NDM-1 with a bleomycin resistance protein in *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, **56**(4): 1693–1697.
- [4] Tangden T, Giske CG. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: clinical perspectives on detection, treatment and infection control [J]. *J Intern Med*, 2015, **277**(5): 501–512.
- [5] Wailan AM, Paterson DL. The spread and acquisition of NDM-1: a multifactorial problem [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2014, **12**(1): 91–115.
- [6] Jin L, Bai XW, Luan N, et al. A Designed tryptophan- and lysine/arginine-rich antimicrobial peptide with therapeutic potential for clinical antibiotic-resistant *Candida albicans Vaginitis* [J]. *J Med Chem*, 2016, **59**(5): 1791–1799.
- [7] Li B, Li B, Tian YW, et al. The anti-biofilm activity against drug-resistance bacterial of antimicrobial peptide BF-30 *in vitro* [J]. *Pharm Biotechnol*, 2015, **22**(1): 14–19.
- [8] Li SA, Lee WH, Zhang Y. Efficacy of OH-CATH30 and its analogs against drug-resistant bacteria *in vitro* and in mouse models [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, **56**(6): 3309–3317.
- [9] Ma LM, Wang YR, Wang MX, et al. Effective antimicrobial activity of Cbf-14, derived from a cathelin-like domain, against penicillin-resistant bacteria [J]. *Biomaterials*, 2016, **87**: 32–45.
- [10] Hao QR, Wang H, Wang J, et al. Effective antimicrobial activity of Cbf-K₁₆ and Cbf-A₇A₁₃ against NDM-1-carrying *Escherichia coli* by DNA binding after penetrating the cytoplasmic membrane *in vitro* [J]. *J Pept Sci*, 2013, **19**(3): 173–180.
- [11] Butt TR, Edavettal SC, Hall JP, et al. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins [J]. *Prot Exp Purif*, 2005, **43**(1): 1–9.
- [12] Giles FJ, Rodriguez R, Weisdorf D, et al. A phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, study of iseganan for the reduction of stomatitis in patients receiving stomatotoxic chemotherapy [J]. *Leukemia Res*, 2004, **28**(6): 559–565.
- [13] Machuca J, Ortiz M, Recacha E, et al. Impact of AAC(6')-Ib-cr in combination with chromosomal-mediated mechanisms on clinical quinolone resistance in *Escherichia coli* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2016, **71**(11): 3066–3071.
- [14] Fomda BA, Khan A, Zahoor D. NDM-1 (New Delhi metallo beta lactamase-1) producing gram-negative bacilli: emergence & clinical implications [J]. *Indian J Med Res*, 2014, **140**(5): 672–678.
- [15] Fan HY, Nazari M, Raval G, et al. Utilizing zeta potential measurements to study the effective charge, membrane partitioning, and membrane permeation of the lipopeptide surfactin [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, **1838**(9): 2306–2312.
- [16] Yuan Q, He L, Ke H. A potential substrate binding conformation of β -lactams and insight into the broad spectrum of NDM-1activity [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, **56**(10): 5157–5163.
- [17] Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, **3**(3): 238–250.
- [18] Oren Z, Shai Y. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides [J]. *Pept Sci*, 1998, **47**(6): 451–463.