

植物环肽生物活性及其作用机制研究进展

覃 婷, 张 军*

广东药科大学生命科学与生物制药学院, 广东省生物技术候选药物重点实验室, 广东 广州 510006

摘 要: 环肽是植物来源的超稳定肽, 是由头至尾环化骨架和形成胱氨酸结的 3 个二硫键组成的非常稳定的化合物。与其他类似肽相比, 环肽的这种独特的拓扑化学结构使它们对化学、热和生物降解异常稳定, 超强的稳定性可使它们在医药学领域方面取得很多进展。植物环肽是植物研究的一个新领域, 由于其具有多种生物活性, 引起了很多科学研究工作者的广泛重视与探究。多肽类药物的低稳定性与低的传递效率阻碍了其发展, 而植物环肽的存在为多肽类药物存在问题的解决提供新的途径。综述了植物环肽的药理活性及其作用机制, 为植物环肽发展成为药物应用于临床提供理论基础。

关键词: 植物环肽; 环半胱氨酸结结构; 生物活性; 作用机制; 抗肿瘤; 抗菌; 杀虫; 溶血

中图分类号: R284.194 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)01-0255-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.01.031

Research progress on biological activities and action mechanisms of cyclotides in plants

QIN Ting, ZHANG Jun

Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology Candidate Drugs, School of Life Science and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Cyclotide is a plant-derived remarkable-stable peptide, which consists of a head-to-tail cyclization skeleton and a cyclic cysteine knot formed by three disulfide bonds. Compared with other similar peptides, the unique topological chemical structure of cyclotides makes them extremely stable to chemical, thermal and biological degradation, and their super-strong stability make them become attractive subject in the field of medicine and pharmacy. Cyclotides in plants are a new field of plant research. Because of their various biological activities, they have attracted extensive attention and exploration from many scientific researchers. The low stability and low delivery efficiency of polypeptide drugs hinder their development, while the existence of cyclotides in plants provides a new way to solve the existing problems of polypeptide drugs. The pharmacological activities and mechanisms of cyclotides in plants are summarized in this paper, which provides theoretical basis for the development of cyclotides in plants into drugs for clinical application.

Key words: cyclotides in plants; cyclic cysteine knot; biological activities; mechanism of action; anti-tumor; antibacterial; insecticidal; hemolysis

植物环肽是 20 世纪 70 年代首次发现于非洲植物 *kalata-kalata* 中的一种具有生物活性的物质^[1]。直到 1995 年才通过核磁共振技术确定其空间结构, 是由 3 对二硫键组成的胱氨酸结(cyclic cysteine knot, CCK)结构(图 1)首尾相连的环肽^[2]。从此, 环肽结构和功能的研究取得了很大的进展, 如在 1999 年将环肽命名为 cyclotides^[3]; 在 1999 年发现具有抑菌活性环肽^[4]; 2001 年首次发现大环肽 *kalata B1*

对 *Helicoverpa armigera* 幼虫具有抑制活性^[5]; 2004 年首次在堇菜科植物香堇菜 *Viola odorata* L. 中发现大环肽 *cycloviolacin*^[6]; 2015 年从堇菜科植物中发现含大量亮氨酸的环肽^[7]; 2019 年, 通过对毛叶黄花堇菜的变种 *Viola pubescens* var. *scabriuscula* Torr. & A. Gray 的转录组进行分析, 从而鉴定其中环肽的差异表达基因^[8]; 至今为止, 植物环肽的研究取得了很大成果, 在医药学领域具有广泛的潜在应用。

收稿日期: 2020-04-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31570506); 广东药科大学创新强校项目(2017KCXTD020)

作者简介: 覃 婷(1995—), 女(壮族), 硕士研究生, 研究方向为植物环肽功能研究。E-mail: Qting016@163.com

*通信作者: 张 军(1980—), 男, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为从事植物药用功能基因研究。E-mail: lsszhangj@gdpu.edu.cn

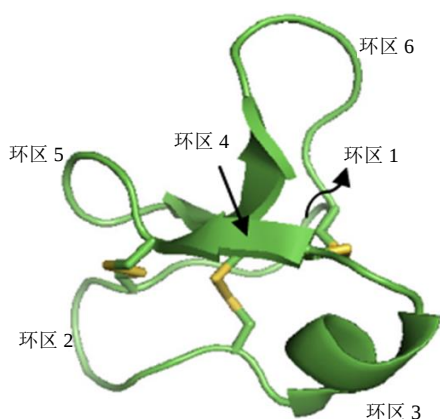


图 1 环肽的 CCK 结构

Fig. 1 Structure of CCK in cyclotides

环肽是植物体内经基因编码在核糖体内合成的一类序列长为 28~37 个氨基酸,由多肽链首尾相连,并与由 6 个固定半胱氨酸组成的三对二硫键

形成稳定的六环结构,即 CCK 结构的环状多肽化合物^[9-10]。环肽的这种独特的保守空间结构特征赋予其很强的耐酶降解能力、热稳定性及化学稳定性^[11-12];并且具有杀虫^[13-16]、抗菌^[4,17]、抗人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)^[18]、抑制癌细胞^[19-20]、促子宫收缩活性^[21]及免疫促进活性^[22]等多种生物活性^[23]。据统计数据发现,目前发现的植物环肽几乎都是从堇菜科和茜草科植物中分离出来的^[24-26],植物环肽也分布于葫芦科、茄科、豆科、禾本科植物等^[9,27-30](表 1),并且所有的堇菜科植物都含有环肽存在^[28]。因此,大环肽资源的挖掘仍是植物研究中的重要部分,在药学研究与农业生产上具有较大的应用前景。植物环肽具有一系列的生物活性,有很大的应用空间及开发价值,然而在研究过程中还有很多的不足亟需解决,所以还要付出更大努力使植物环肽尽早应用于临床,造福人类。

表 1 环肽在植物中的分布 (<http://www.cybase.org.au/>)Table 1 Distribution of cyclotides in plants (<http://www.cybase.org.au/>)

来源	植物名	环肽名称
堇菜科 (Violaceae)	香堇菜	kalata B1, kalata S, vodo M、N, cycloviolacin O1~36, voc C
	宝山堇菜 <i>V. baoshanensis</i> Shu, Liu et Lan.	kalata B1, kalata S, cycloviolacin Y5, viba 1~17
	紫花地丁 <i>V. yedoensis</i> Makino	kalata B1, kalata S, cycloviolacin O2、O12, cycloviolacin Y1~Y5, viba 11、15、17, mra 30
	三色堇菜 <i>V. tricolor</i> L.	kalata B1, kalata S, tricyclon A、B, vodo M、N, vaby C, oak 6 cyclotide1, cycloviolacin O4、12、22、28, vigno 3~7、9、10, vitri A~F, varv peptide B~D、F~H, vibi C、G, viba 9、11、15、32, vitri peptide 1~4、8、9a、14、18a/b、20~21、22a、23、24、27a、28~30、36~39、50、53、94b, mra 30
	田野堇菜 <i>V. arvensis</i> Murray	kalata S, tricyclon A, cycloviolacin O12, varv peptide B~D、F~H, violapeptide 1
	双花堇菜 <i>V. biflora</i> L.	kalata S, cycloviolacin O2、9, vibi A~K
	<i>V. ignobilis</i> Rupr.	kalata S, vigno 1~10
	常春藤叶堇菜 <i>V. hederacea</i> Labill.	vhr 1, cycloviolacin H1~H4, vhl-1、2
	长萼堇菜 <i>V. inconspicua</i> Blume	cyl 1~6, vinc A、B
	<i>V. abyssinica</i> Steud. ex Oliv.	vaby A~E, cycloviolacin O12
	钩距堇菜 <i>V. adunca</i> Sm.	cycloviolacin O8
	<i>V. pinetorum</i> Greene.	vpl-1, vpf-1
	美洲犬堇菜 <i>V. labridorica</i> Schrank.	vila A~C
	毛叶黄花堇菜	vpub A~C
	七星莲 <i>V. diffusa</i> Ging.	vdif A
	大花杯状堇菜 <i>V. cotyledon</i> Ging.	vico A、B
	天山堇菜 <i>V. tianshanica</i> Maxim.	cycloviolacin O12、T1

续表 1

来源	植物名	环肽名称
堇菜科 (Violaceae)	<i>G. blakeanum</i> (Standl.) Hekking	globa A~F, mra 23
	<i>G. pauciflorum</i> Hekking	glopa A~E
	蜜花堇 <i>Melicytus ramiflorus</i> J. R. Forst. et G. Forst.	mra1-5、13、14a、14b、17a、22~26、29、30、30a
	<i>Rinorea dentata</i> (P. Beauv.) Kuntze	riden A
	<i>M. chathamicus</i> (F. Muell.) Garn. -Jones	mech 1~7
	<i>M. latifolius</i> (Lindl.) P. S. Green	mela 1~7
	<i>M. angustifolius</i> (R. Br. ex DC.) Garn. -Jones	mang A
	倒卵叶蜜花堇 <i>M. obovatus</i> (Kirk) Garn. -Jones	mobo A、B
	<i>Hybanthus parviflorus</i> (L.f.) Baill.	hyPa A
	<i>Leonia cymose</i> Mart.	cycloviolin A~D
	<i>Noisetia orchidiflora</i> (Rudge) Gingins	nor A
	<i>Pombalia calceolaria</i> L.	cycloviolacin O4, poca A、B
	<i>L. triandra</i> Cuatrec. ex L. B. Sm. & A. Fernández	ltri A
	<i>H. floribundus</i> E. Muell.	hyfl A~F
	<i>H. floribundus</i> W. Muell.	hyfl I~M
	<i>M. dentatus</i> (R. Br. ex DC.) Molloy & Mabb.	mden A~C、E~N
	鳞隔堇 <i>R. virgata</i> (Thwaites) Kuntze	rivi 1~7
茜草科 (Rubiaceae)	<i>Oldenlandia affinis</i> (Roem. & Schult.) DC.	kalata B1~B19、S、B9 linear、B10 linear, oak 6 cyclotide 1~2, oak 7 cyclotide, oak 8 cyclotide
	<i>Palicourea condensate</i> Standl.	palicourein
	<i>Chassalia parvifolia</i> K. Schum.	circulin A~F
	<i>Chassalia chartacea</i> Craib.	circulin A, chassatide C1~C18
	弯管花 <i>Chassalia curviflora</i> (Wall.) Thwaites	chacur 1
	<i>Psychotria brachiate</i> Sw.	psybra 1
	<i>Psychotria poeppigiana</i> Müll. Arg.	psypoe 1
	<i>Psychotria brachyceras</i> Müll. Arg.	psybry A~C, psyleio A、B, psyleio D
	<i>Psychotria leiocarpa</i> Cham. & Schltdl.	psyleio A~E
	<i>Psychotria longipes</i> Müll. Arg.	cyclopsychotride A
	双花耳草 <i>H. biflora</i> (Linn.) Lam.	hedyotide B1、B2
	<i>Psychotria solitudinum</i> Standl.	psysol 2
	<i>Palicourea guianensis</i> Aubl.	pali A
	<i>Palicourea tetragona</i> Ruiz&Pav.	cycloviolacin O22, paltet 1, vibi B
	<i>Psychotria leptothyrsa</i> Miq.	psyle A~F, vibi G、H
	吐根九节 <i>Psychotria ipecacuanha</i> (Brot.) Standl.	caripe 1、2、4、6~8、10~13
	<i>H. centranthoides</i> (Hook. & Arn.) Steud.	hcf-1, hcf-1 variant
	<i>H. terminalis</i> (Hook. & Arn.) Hillebr.	hcf-1
	<i>Psychotria suterella</i> Müll. Arg.	PS-1
	<i>Chassalia discolor</i> K. Schum.	CD-1
豆科 (Fabaceae)	蝶豆 <i>Clitoria ternatea</i> Linn.	cliotide T1、T2、T6、T8~T21、T28、T32~T33、 T40、T54、T55, cter A~R、1~13、15、18~20、 25、28~33、35~37, CT 22、23、25~27、30、 31、42、45
茄科 (Solanaceae)	<i>Petunia integrifolia</i> (Hook.) Schinz & Thellung	phyb D
	腋生矮牵牛 <i>Petunia axillaris</i> (Lam.) B. S. P.	phyb A、E、H、I
	<i>Petunia x hybrida</i> C.	phyb A~C、E、F、I~L
禾本科 (Poaceae)	<i>Panicum laxum</i> Sw.	panitide L1~L9
葫芦科 (Cucurbitaceae)	木鳖子 <i>M. cochinchinensis</i> (Lour.) Spreng.	mCoT I-3、I-5、I-6
	云南木鳖 <i>M. dioica</i> Roxb. ex Willd.	modi 6

1 作用机制

近 30 年来,已有很多研究报道了环肽在不同科属植物中的分布及其变异性。环肽具有多种生物活性,研究发现,环肽与细胞膜发生相互作用是其产生生物活性的主要原因^[31-33]。环状骨架是环肽分子与膜相互作用过程中所必需的^[34],同时,其表面独特的疏水性区域能调节其与膜相互作用,但它们的具体作用模式或机制并不太清楚^[35-36]。虽然尚不能对环肽具体作用机制进行完全阐明,但大多数研究表明,植物环肽的生物活性取决于环肽的结构与细胞膜组成^[15,37-38];环肽具有活性是因其结构、净电荷和疏水性,与膜相互作用导致膜通透性改变的结果,强烈依赖于环肽独特的结构特征^[36,39-41]。研究表明,膜结合是功能性的,因为环肽能够诱导磷脂囊泡的内容物泄漏,并在脂质双层中形成大孔^[41],膜结合调节细胞毒性。

CCK 结构的存在,赋予环肽较直链肽超强的耐热、耐化学降解及耐酶解的能力^[42]。有研究表明,当 kalata B1 的 CCK 结构发生变化时,修饰后的衍生物不具有相应的抗 HIV 活性^[43]。Ireland 等^[44]对植物环肽抗 HIV 的构效关系分析表明除了植物环

肽的环状骨架对活性有影响外,植物环肽上某些 loop 区域的疏水性也与抗 HIV 的活性有关,而生物测定试验表明,环肽类和非环肽类具有相当的活性,表明环肽骨架可能不是活性的必要要求^[45],但对维持环肽结构完整性具有重要性。由于潜在的药用价值,更多的大环肽被挖掘出抗 HIV 活性,研究发现环状骨架是抗 HIV 所必须的,大环肽的疏水性与抗 HIV 活性呈相关性,而且环肽抑制 HIV 病毒逆转录酶活性的能力似乎表明抗病毒活性发生在病毒进入宿主细胞之前,但是作用机制仍不清楚^[18,43-44,46]。研究还发现将胰蛋白酶抑制剂亚家族环肽 MCOTI-II 的环 3、5 或 6 替换到 Möbius 亚家族环肽 kalata B1 的相应环中,降低了其溶血和细胞毒性活性,且大大降低了其细胞穿透性。另一方面,用 kalata B1 的相应环取代 MCOTI-II 的环,嵌合体环肽并不会产生细胞毒性^[47]。说明独特的环序列对相应环肽的结构有重要影响,从而对环肽生物活性产生影响。

环肽已被分为 3 个亚家族,称为 Möbius、bracelet 和胰蛋白酶抑制剂(squash trypsin inhibitor, squash TI)环肽亚家族^[48](图 2)。相邻半胱氨酸

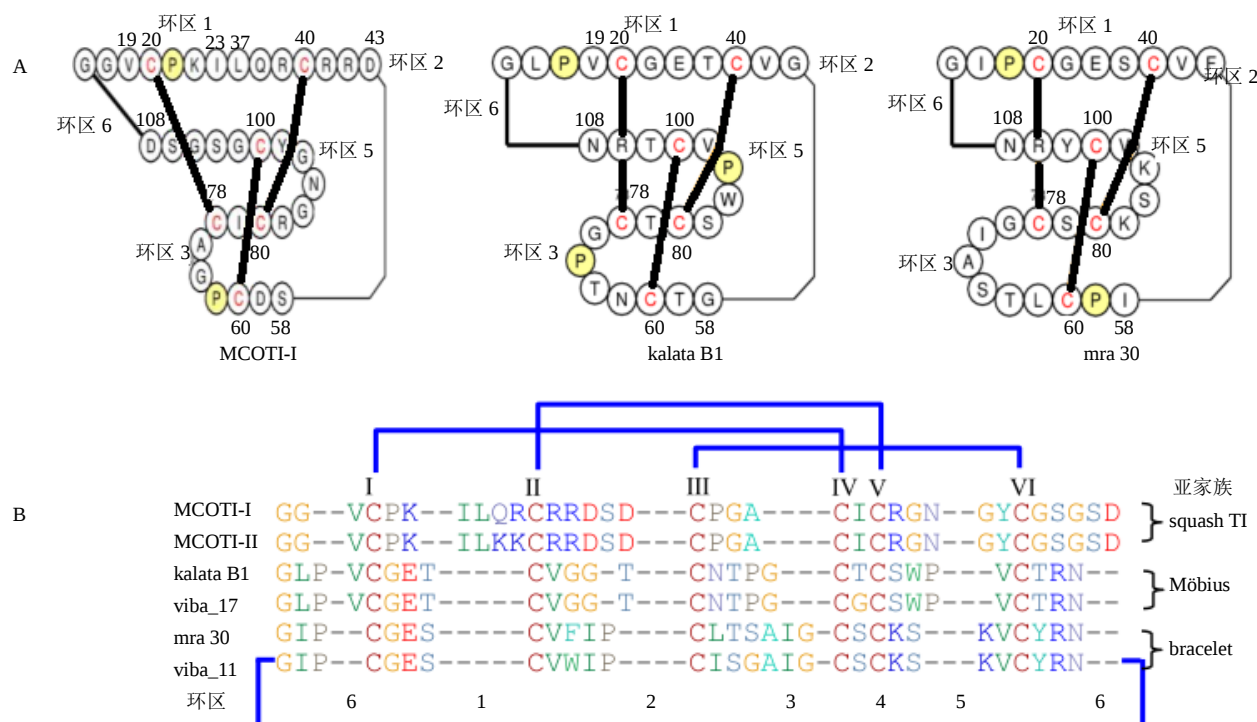


图 A 中粗线表示二硫键, 图 B 中二硫键和首尾环化均用直线表示

The thick lines indicate disulfide bonds in figure A, the disulfide bonds and head-to-tail cyclization are both indicated by lines in figure B

图 2 大环肽的结构框架图 (A) 和序列比对图 (B)

Fig. 2 Structural frameworks (A) and primary sequences (B) of cyclotides

(C) 之间的环区被标注为 1~6。一般而言, Möbius 和 bracelet 亚家族大环肽的环区 1 包括 1 个保守的谷氨酸 (E); Möbius 亚家族大环肽序列长度多为 28~29 个氨基酸, 其环区 5 包含 1 个标志性的脯氨酸 (P); bracelet 亚家族序列长度多为 30~32 个氨基酸; squash TI 亚家族大环肽分布于葫芦科植物, 序列长度多为 33~34 个氨基酸, 且环区序列与其他亚家族差异较大, 诸如环区 1 和 6。尽管不同亚家族都具有 CCK 结构, 但它们组成环的氨基酸残基不一样, 因此活性也截然不同。如 Möbius 亚家族中的 kalata B1, 谷氨酸是调节其生物活性的重要氨基酸残基, 一旦发生酯化反应其生物活性就会降低^[49]; 而 bracelet 亚家族环 5 含有成簇的带电氨基酸, 能产生微摩尔单位抑菌效果, 强于 Möbius 亚家族^[38]。有研究表明, 化学修饰的环肽衍生物, 其中单个残基相继被丙氨酸取代, 证实在环肽表面有一片残基聚集, 对生物活性很重要^[15]。有研究表明蛋氨酸残基的氧化导致生物活性的丧失, 增强了疏水区域对膜相互作用的重要性^[45]。研究表明细胞毒性活性和它们的疏水性之间并没有很强的相关性。相反, 似乎更像是带电和疏水氨基酸残基的分布决定了最终的效力。此外, 研究还发现, 虽然谷氨酸残基在维持 bracelet 亚家族环肽 cycloviolacin O2 的活性非常重要, 但在 Möbius 环肽中却不太重要; 而且在 bracelet 亚家族中, 含有几个阳离子残基的环肽的活性略高于中性净电荷的活性^[38]。

对带电氨基酸残基谷氨酸、精氨酸、赖氨酸、色氨酸进行化学修饰, 研究发现, 色氨酸残基对 Möbius 亚家族环肽 varv A 和 bracelet 亚家族环肽 cycloviolacin O2 的生物活性具有同等重要意义^[38]; 对 Möbius 亚家族中 varv A 的谷氨酸进行修饰, 其活性降低 300%; 而在 bracelet 亚家族中 cycloviolacin O2, 对谷氨酸进行酯化会使活性大幅度降低^[49]。对谷氨酸修饰后的大环肽进行核磁结构鉴定, 显示甲基化或乙酰化修饰影响 cycloviolacin O2 环 3 处 α -螺旋的氢键形成。氢键的缺失明显影响了 α -螺旋的柔韧性, 使其生物学活性大大降低^[50]。修饰 kalata B1 的谷氨酸或用谷氨酸代替 kalata B12 中的天冬氨酸, 会降低氧化折叠效率, 对谷氨酸进行化学修饰, 环肽的生物活性会丧失; 因此, 谷氨酸的存在提高了环肽的稳定性, 并且对于环肽的细胞膜破坏活性至关重要^[51]。cycloviolacin O2 中带电的谷氨酸和赖氨酸残基的化学掩蔽导致对沙门氏菌的活性几乎完

全丧失, 而掩蔽精氨酸, 活性则降低不太明显^[52]。

环肽具有跨膜屏障和进入细胞的能力; 特别是 Mobius 和 bracelet 亚家族的环肽已被发现具有脂质结合结构域, 这允许特异性识别生物膜中的磷脂酰乙醇胺 (phosphatidylethanolamine, PE), 这种脂质选择性与环肽高度保守的三维结构密切相关, 对其报道的生物学活性和细胞穿透能力具有重要意义^[53]; 如 kalata B1 可以通过细胞内吞途径或直接膜易位进入细胞, 就是通过将 PE 磷脂靶向细胞表面并诱导膜变形来启动通路的^[54]。kalata B1 的抗 HIV 活性也是因为它具有靶向和破坏 HIV 毒颗粒膜的能力, 这些颗粒膜是富含 PE 磷脂的膜^[55]。而胰蛋白酶抑制剂家族中缺少这种与细胞膜结合的结构, 使得其具有不同于其他类型大环肽的理化性质与生物活性, 但仍能透过细胞膜。Shenkarev 等^[56]采用 dodecylphosphocholine micelles 作为细胞膜模型, 通过特异性识别细胞膜上的 PE, 测定 kalata B1 与细胞膜结合的方位。但这种具体作用机制尚不明确。

2 植物环肽的生物活性

2.1 抗 HIV 活性

由于环肽潜在的药理应用, 其抗 HIV 活性得到了广泛研究。近年来, 来自 bracelet 和 Möbius 亚家族的环肽被证明有抗 HIV 活性, 见表 2。

研究表明, cycloviolacin O2 可能是靶向单核细胞中 HIV-1 的理想候选物, 它们被纳入辅助治疗方法可能会提高 HIV-1 蛋白酶抑制剂的疗效, 并最终促进病毒的消除^[61]。最新研究表明, cycloviolacin O2 的膜活性可能有助于抑制病毒载量并提高抗逆转录

表 2 具有抗 HIV 活性的环肽分布

Table 2 Distribution table of cyclotides with anti-HIV activity

环肽名称	来源	亚型	文献
circulin A~F	<i>C. parvifolia</i> K.Schum.	bracelet	4, 26, 57
cycloviolacin Y ₁ ~Y ₄	紫花地丁	bracelet	18
cycloviolacin Y ₅	宝山堇菜	bracelet	18
cycloviolacin A~D	<i>L. cymose</i> Mart.	bracelet	58
kalata B1	<i>O. affinis</i> (Roem. & Schult.) DC.	Möbius	18, 43
kalata B8	<i>O. affinis</i> (Roem. & Schult.) DC.	bracelet	59
vhl-1	常春藤叶堇菜	bracelet	46
varv A, E	三色堇菜	Möbius	60
cycloviolacin O2	香堇菜	bracelet	61
palicourein	<i>P. condensate</i> Standl.	bracelet	62
cycloviolacin O13、香堇菜		bracelet	44
O14, O24			

病毒药物的疗效^[63]。

2.2 细胞毒活性及抗肿瘤活性

相对于其他抗菌肽,环肽抗肿瘤活性最突出的特点表现在选择性对肿瘤细胞发挥细胞毒性^[19,60,64]。从香堇菜中分离出了环肽 cycloviolacin O2,该环肽能够分解人淋巴瘤细胞系 U-937 GTB 细胞的细胞膜,对钙黄绿素负载的 HeLa 细胞和脂质体的功能研究显示,它们各自的内容物以浓度相关性快速释放^[65]。目前的结果表明,环肽具有特定的细胞膜破坏活性。从紫花地丁中提取出了 viphi A、F、G 均对肿瘤 MM96L、HeLa、BGC-823 细胞系和非肿瘤 HFF-1 细胞系显示出了细胞毒活性^[20]。Yeshak 等^[66]在 *Viola abyssinica* 中发现了 vaby A、D 2 种环肽,它们均对淋巴瘤细胞系 U-937 GTB 细胞表现出剂量相关性细胞毒性。研究发现 vaby A、D 在其序列中都含有带电荷的残基,但 vaby A 的净电荷是中性的,而 vaby D 是带负电荷的肽。据报道,环肽的细胞毒性活性与其净电荷含量和带电残基含量相关^[67]。Gerlach 等^[68]在双花堇菜中发现了环肽 psyle A、C、E 并且研究发现它们对淋巴瘤细胞系 U-937 GTB 细胞显示出了浓度相关性细胞毒性。Claeson 等^[69]对田野堇菜进行了初步筛选的分级。使用葡聚糖凝胶 LH-20 吸附色谱法,活性化合物被浓缩成 2 个级分,用反相色谱法从这 2 个级分中分离出 varv A、F;而 Lindholm 等^[19]检测了 Varv A、F 对 10 种人类肿瘤细胞系的细胞系,表现出了对不同细胞系有不同的影响,半数抑制浓度 (IC₅₀) 值为 2.7~7.5 μmol/L。就目前而言,环肽分子的体外实验比较广泛,体内实验较少,而急性毒性实验目前尚无研究。因此,环肽的细胞毒活性作用要想在临床上得到广泛的应用,就必须加强对体内和急性毒性实验的研究。具有细胞毒活性的植物环肽见表 3。

表 3 具有细胞毒活性的植物环肽

Table 3 Cyclotides with cytotoxic activity in plants

名称	来源	亚家族	文献
clotide T1~T4	蝶豆	bracelet	70
psyles A、E	<i>P. leptothyrsa</i> Miq.	bracelet	68
varv A	三色堇菜	Möbius	60
varv E	<i>V. abyssinica</i>	Möbius	66
varv peptide A	宝山堇菜、田野堇菜	Möbius	25
varv peptide F	田野堇菜、三色堇菜	Möbius	25
vibi G、E、H	双花堇菜	bracelet	64
vitri A、F	三色堇菜	bracelet	60、71

2.3 抗菌活性

目前研究主要报道了 Mobius 和 bracelet 2 类大环肽都存在抗菌活性^[52,72],其抗菌机制可能是由于它们分子表面不同区域兼有疏水区和亲水区而具备两性分子的特性。Pränting 等^[52]在香堇菜中用反相高效液相色谱法分离出典型的环肽,包括 Mobius 亚族 kalata B1 和 bracelet 亚族 cycloviolacin O2。用放射扩散法和最低抑菌浓度实验及时间-杀菌动力学的方法研究环肽对大肠杆菌、抗沙门氏菌血清型鼠伤寒沙门氏菌 LT2 和金黄色葡萄球菌 3 种细菌的抗菌活性。结果表明 cycloviolacin O2 对沙门氏菌血清型鼠伤寒沙门氏菌 LT2 和大肠杆菌的抑制活性较强;cycloviolacin O2 能够有效杀死革兰阴性菌,包括耐药菌株肺炎克雷伯菌和铜绿假单胞菌,Pränting 等^[52]认为这与带电的谷氨酸和赖氨酸残基的化学掩蔽有关。

2.4 杀虫活性

Göransson 等^[73]研究了从香堇菜中分离得到的 cycloviolacin O2 对海洋污损生物藤壶的作用,结果表明 cycloviolacin O2 对藤壶具有抑制作用,且呈量效关系。藤壶是最具代表性的海洋污损生物,隶属于节肢动物门 (Arthropoda)、甲壳纲 (Crustacea)、围胸目 (Thoracica),它的幼虫在海水中漂浮 15~20 d,逐渐成熟附着在潮间带的礁石以及船只等设施的表面,分泌出有强吸附作用的藤壶胶,渗入到附着物的表面缝隙及微孔结构里,形成十分强大的吸附力,破坏这些表面^[74-75]。藤壶又称海洋附着生物,当它大量繁衍且未能及时清理就会造成很大的危害,如给水产养殖和航运带来了严重的技术和经济问题。而且 cycloviolacin O2 对藤壶的作用在生物测定中是可逆和无毒的。因此,cycloviolacin O2 在净化海洋环境中有很好的应用前景。还有研究表明 cycloviolacin O2 吞噬指数增加,证明其在体内的抗葡萄球菌活性可能与吞噬活性有关,此外还与直接的抗致病活性有关^[76]。具有杀虫活性和抗菌活性的植物环肽见表 4。

2.5 溶血活性

据报道,许多环肽具有溶血活性,并且它们在体内与膜相互作用^[5]。Wang 等^[18]从光瓣堇菜中发现环肽 cycloviolacins Y4、Y5 具有溶血活性。将这 2 种环肽用于人类红细胞的体外溶血活性实验研究,并以蜂毒素作为阳性对照,结果表明这两种环肽的半数溶血 (HD₅₀) 值均低于蜂毒素的 HD₅₀ 值,且

二者溶血活性都比原型环肽 kalata B1 更强。Tang 等^[71]探究了三色堇菜的 9 种环肽提取物以蜂毒素为阳性对照对人类血红细胞的溶血活性试验, 结果表明, 环肽具有不同程度的溶血活性, HD₅₀ 值范围为 4.29~225.90 μmol/L。Vitri B 溶血作用最小, vitri D 溶血作用最强。具有溶血活性的植物环肽见表 5。

表 4 具有杀虫活性和抗菌活性的植物环肽分布

Table 4 Distribution table of plant cyclotides with insecticidal and antibacterial activity

环肽名称	来源	活性	文献
clotide T1~T4	蝶豆	抗菌	70
circulin A、B	<i>C. parvifolia</i> K.Schum.	抗菌	4
kalata B1、B2	<i>O. affinis</i> (Roem. & Schult.) DC.	抗菌、杀虫	21、52、77-78
panitides L1~L9	<i>P. laxum</i> Sw.	抗菌	27
cycloviolacin O2	香堇菜	抗菌	52、76
vaby A、D	<i>V. abyssinica</i>	抗菌	52
cyclopsychotride A	<i>P. longipes</i> Müll.Arg.	抗菌	4
cycloviolacin O1、O3、O8、O13、O16、O24	香堇菜	杀虫	77
cycloviolacin O14、O15	香堇菜	杀虫	78

表 5 具有溶血活性的植物环肽分布

Table 5 Distribution of plant cyclotides with hemolytic activity

环肽名称	来源	亚型	文献
clotide T1~T4	蝶豆	bracelet	70
circulin A、B	<i>C. parvifolia</i> K.Schum.	bracelet	4
cycloviolacin O14	香堇菜	Möbius	11
cycloviolacin Y1~Y5	宝山堇菜、紫花地丁	bracelet	18
kalata B1	<i>O. affinis</i> (Roem. & Schult.) DC.	Möbius	43
varv. peptide A	宝山堇菜、田野堇菜	Möbius	25
varv. peptide I	田野堇菜	bracelet	25

2.6 其他

环肽还具有蛋白酶抑制活性, 目前从堇菜属植物中发现了 4 种环肽 cycloviolacin O13、14、16、24 具有蛋白酶抑制活性。Ireland 等^[11]以 kalata B1 为阳性对照, 考察了这 4 种环肽对胃蛋白酶、胰蛋白酶、嗜热菌蛋白酶的抑制作用, 结果显示 kalata B1 在 5 min 内即完全降解, 环肽在 6 h 时还均未降解。充分证明环肽可以抑制蛋白酶的降解。环肽还能促进子宫收缩, 如 Gran^[1,79]对 kalata-kalata 植物的沸水

提取物进行分离发现了具有子宫收缩活性的 kalata B1, 并作用于大鼠、兔子和人, 它们的子宫收缩肌呈 OT 状。研究确定了天然 kalata B1 和 2 种嫁接环肽(缓激肽拮抗剂 CKB-KAL 和 CKB-KIN)在大鼠中通过口服和静脉注射的药动学参数, 并为天然和接枝环肽提供了可参考的药动学参数。本研究表明, 天然和嫁接环肽的体内生物半衰期与临床使用的肽类药物相当, 所测试的环肽具有与市场上的肽类药物相当的高的药物效率, 暗示了低可能性的非靶点效应和毒性, 因此是一种可行的药物设计支架, 具有可调节的药动学性质^[80]。

3 总结与展望

近 10 年, 植物环肽在医药学领域不断发展, 在药物中得到了应用。Thongyoo 等^[81]和 Sommerhoff 等^[82]用减少环肽环 6 中的残基数量, 或设计 1 种嵌合环肽, 其中部分序列被结构相似的蛋白酶抑制剂片段所取代的方法研究开发了 β-类胰蛋白酶抑制剂环肽, 可作为治疗过敏性哮喘和炎症性疾病的治疗靶点。通过针对合成肽库筛选蛋白酶、分子建模或使用相关抑制剂的已知特异性数据来鉴定环肽序列替换, 用序列替换的方法开发出了人凝血因子 XIIa 和基质蛋白酶抑制剂, 用这种方法主要是替换环肽环 1 的序列, 因为环 1 是 squash TI 亚家族环肽的主要结合环^[83-84]。SET 蛋白能够抑制癌基因蛋白磷酸酶 2A (PP2A) 发挥作用, COG 肽是 SET 蛋白的有效拮抗剂; 但由于 COG 肽水解稳定性差及生物利用低, 导致 COG 肽的应用受到了限制。D'Souza 等^[85]将 COG 肽嫁接到超稳定的环肽支架 MCoTI-II 上, 变成嫁接环肽 MCOG, 研究表明 MCOG 对癌细胞具有细胞毒性, 在血清中具有较高的稳定性, 证明了环肽 MCoTI-II 在开发用于治疗癌症的肽药物中的应用。2015 年, 从热带雨林植物堇菜科植物 *R. dentata* (P. Beauv.) Kuntze 发现环肽 riden A, 具有微弱的促进子宫收缩作用, 在尼日利亚西南部发现有部分牧民利用该植物来帮助动物分娩, 但在民族医学中, 还需要在更大的范围内进行进一步的研究^[86]。细胞穿透肽是细胞内传递亲水分子的理想载体, 但它们作为药物的应用因其在血清中的低稳定性而受到损害, Huang 等^[87]对药物设计中研究最广泛的环肽支架之一 MCoTI-II 进行了修饰, 修饰后的 MCoTI-II 与标准细胞穿透肽一样有效, 并且细胞内化效率更高, 还保持了所有所需的特征作为模板来移植所需的生物活性。环肽[T20K] kalata B1 经口服

给药可显著延缓和减轻小鼠自身免疫性脑髓炎的症状,抑制淋巴细胞增殖和减少促炎细胞因子,特别是白细胞介素-2,环肽严重阻碍了疾病的进展,没有表现出不良反应。因此,环肽是作为治疗 T 细胞介导的疾病的肽药物^[88]。

植物环肽独特的结构骨架、广泛的生物活性、潜在的生物可获得性以及目前研究所显示出的分子多样性使得植物环肽成为一类在医药和植物保护上极有应用前景的物质。植物环肽一方面由于其内在的活性可能被直接用作药物或作为新药研究和设计的优良先导结构;另一方面由于其精确的三维结构、高稳定性和其中一些环区中氨基酸残基的可变性,可连接其他新颖活性物质而成为在多肽药物设计上非常有用的支架。环肽已被证明能够渗透人类细胞膜,并能够有效地靶向蛋白质-蛋白质在体外的相互作用,但更重要的是在动物模型中。虽然还没有环肽达到人类临床试验,但从动物模型中获得几种生物活性环肽的结果表明,这在不久的将来可能会发生。植物环肽对肿瘤细胞具有很强的细胞毒活性,不会影响正常细胞的正常生长,有望成为一类高效低毒的抗肿瘤药物。在非洲传统医药中,环肽促进子宫收缩活性已经得到广泛的应用,还有待于现代医药学研究技术将其开发为高效低毒药物应用于临床。植物环肽还具有强杀虫活性,推测它可以用基因工程方法构建抗飞蛾及相关昆虫的转基因植物,以实现潜在的植物农药应用价值。但目前植物环肽药理研究还存在许多不足,各种药理活性的作用机制还有待进一步明确。综上所述,植物环肽在医药学领域具有很大的应用空间及开发价值,需要不断克服在研究过程中出现的不足与困难,将植物环肽早日应用于临床。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Gran L. On the effect of a polypeptide isolated from “kalata-kalata” (*Oldenlandia affinis* DC) on the oestrogen dominated uterus [J]. *Acta Pharmacol Toxicol*, 2009, 33(5/6): 400-408.
- [2] Saether O, Craik D J, Campbell I D, *et al.* Elucidation of the primary and three-dimensional structure of the uterotonic polypeptide kalata B1 [J]. *Biochemistry*, 1995, 34(13): 4147-4158.
- [3] Craik D J, Daly N L, Bond T, *et al.* Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif [J]. *J Mol Biol*, 1999, 294(5): 1327-1336.
- [4] Tam J P, Lu Y A, Yang J L, *et al.* An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(16): 8913-8918.
- [5] Jennings C, West J, Waine C, *et al.* Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: The cyclic knotted proteins from *Oldenlandia affinis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(19): 10614-10619.
- [6] Dutton J L, Renda R F, Waine C, *et al.* Conserved structural and sequence elements implicated in the processing of gene-encoded circular proteins [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(45): 46858-46867.
- [7] Ravipati A S, Henriques S T, Poth A G, *et al.* Lysine-rich cyclotides: A new subclass of circular knotted proteins from Violaceae [J]. *ACS Chem Biol*, 2015, 10(11): 2491-2500.
- [8] Sternberger A L, Bowman M J, Kruse C P S, *et al.* Transcriptomics identifies modules of differentially expressed genes and novel cyclotides in *Viola pubescens* [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 156.
- [9] Poth A G, Chan L Y, Craik D J. Cyclotides as grafting frameworks for protein engineering and drug design applications [J]. *Biopolymers*, 2013, 100(5): 480-491.
- [10] White A M, Craik D J. Discovery and optimization of peptide macrocycles [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2016, 11(12): 1151-1163.
- [11] Ireland D C, Colgrave M L, Craik D J. A novel suite of cyclotides from *Viola odorata*: Sequence variation and the implications for structure, function and stability [J]. *Biochem J*, 2006, 400(1): 1-12.
- [12] Shafee T, Harris K, Anderson M. Biosynthesis of cyclotides [J]. *Adv Bot Res*, 2015, 76: 227-269.
- [13] Simonsen S M, Sando L, Ireland D C, *et al.* A continent of plant defense peptide diversity: Cyclotides in Australian *Hybanthus* (Violaceae) [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(11): 3176-3189.
- [14] Barbata B L, Marshall A T, Gillon A D, *et al.* Plant cyclotides disrupt epithelial cells in the midgut of lepidopteran larvae [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(4): 1221-1225.
- [15] Simonsen S M, Sando L, Rosengren K J, *et al.* Alanine scanning mutagenesis of the prototypic cyclotide reveals

- a cluster of residues essential for bioactivity [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(15): 9805-9813.
- [16] Pinto M F, Fensterseifer I C, Migliolo L, et al. Identification and structural characterization of novel cyclotide with activity against an insect pest of sugar cane [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(1): 134-147.
- [17] Ovesen R G, Brandt K K, Göransson U, et al. Biomedicine in the environment: Cyclotides constitute potent natural toxins in plants and soil bacteria [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2011, 30(5): 1190-1196.
- [18] Wang C K, Colgrave M L, Gustafson K R, et al. Anti-HIV cyclotides from the Chinese medicinal herb *Viola yedoensis* [J]. *J Nat Prod*, 2008, 71(1): 47-52.
- [19] Lindholm P, Göransson U, Johansson S, et al. Cyclotides: A novel type of cytotoxic agents [J]. *Mol Cancer Ther*, 2002, 1(6): 365-369.
- [20] He W, Chan L Y, Zeng G, et al. Isolation and characterization of cytotoxic cyclotides from *Viola philippica* [J]. *Peptides*, 2011, 32(8): 1719-1723.
- [21] Gran L, Sletten K, Skjeldal L. Cyclic peptides from *Oldenlandia affinis* DC. molecular and biological properties [J]. *Chem Biodivers*, 2008, 5(10): 2014-2022.
- [22] Nguyen K N, Nguyen G K, Nguyen P Q, et al. Immunostimulating and gram-negative-specific antibacterial cyclotides from the butterfly pea (*Clitoria ternatea*) [J]. *Febs J*, 2016, 283(11): 2067-2090.
- [23] Oguis G K, Gilding E K, Jackson M A, et al. Butterfly pea (*Clitoria ternatea*), a cyclotide-bearing plant with applications in agriculture and medicine [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 645.
- [24] Witherup K M, Bogusky M J, Anderson P S, et al. Cyclopsychotride A, a biologically active, 31-residue cyclic peptide isolated from *Psychotria longipes* [J]. *J Nat Prod*, 1994, 57(12): 1619-1625.
- [25] Göransson U, Luijendijk T, Johansson S, et al. Seven novel macrocyclic polypeptides from *Viola arvensis* [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(2): 283-286.
- [26] Gustafson K R, Walton L K, Sowder R C Jr, et al. New circulin macrocyclic polypeptides from *Chassalia parvifolia* [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63(2): 176-178.
- [27] Nguyen G K, Lian Y L, Pang E W, et al. Discovery of linear cyclotides in monocot plant *Panicum laxum* of Poaceae family provides new insights into evolution and distribution of cyclotides in plants [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(5): 3370-3380.
- [28] Burman R, Yeshak M Y, Larsson S, et al. Distribution of circular proteins in plants: Large-scale mapping of cyclotides in the Violaceae [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 855.
- [29] Niyomploy P, Chan L Y, Poth A G, et al. Discovery, isolation, and structural characterization of cyclotides from *Viola sumatrana* Miq. [J]. *Biopolymers*, 2016, 106(6): 796-805.
- [30] Niyomploy P, Chan L Y, Harvey P J, et al. Discovery and characterization of cyclotides from *Rinorea* species [J]. *J Nat Prod*, 2018, 81(11): 2512-2520.
- [31] Wang C K, Wacklin H P, Craik D J. Cyclotides insert into lipid bilayers to form membrane pores and destabilize the membrane through hydrophobic and phosphoethanolamine-specific interactions [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(52): 43884-43898.
- [32] Craik D J. Host-defense activities of cyclotides [J]. *Toxins* (Basel), 2012, 4(2): 139-156.
- [33] Park S, Strömstedt A A, Göransson U. Cyclotide structure-activity relationships: Qualitative and quantitative approaches linking cytotoxic and anthelmintic activity to the clustering of physicochemical forces [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e91430.
- [34] Daly N L, Love S, Alewood P F, et al. Chemical synthesis and folding pathways of large cyclic polypeptides: Studies of the cystine knot polypeptide kalata B1 [J]. *Biochemistry*, 1999, 38(32): 10606-10614.
- [35] Shenkarev Z O, Nadezhdin K D, Lyukmanova E N, et al. Divalent cation coordination and mode of membrane interaction in cyclotides: NMR spatial structure of ternary complex Kalata B7/Mn²⁺/DPC micelle [J]. *J Inorg Biochem*, 2008, 102(5/6): 1246-1256.
- [36] Henriques S T, Huang Y H, Castanho M A, et al. Phosphatidylethanolamine binding is a conserved feature of cyclotide-membrane interactions [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(40): 33629-33643.
- [37] Huang Y H, Colgrave M L, Clark R J, et al. Lysine-scanning mutagenesis reveals an amendable face of the cyclotide kalata B1 for the optimization of nematocidal activity [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(14): 10797-10805.
- [38] Burman R, Herrmann A, Tran R, et al. Cytotoxic potency of small macrocyclic knot proteins: Structure-activity and mechanistic studies of native and chemically modified

- cyclotides [J]. *Org Biomol Chem*, 2011, 9(11): 4306-4314.
- [39] Kamimori H, Hall K, Craik D J, *et al.* Studies on the membrane interactions of the cyclotides kalata B1 and kalata B6 on model membrane systems by surface plasmon resonance [J]. *Anal Biochem*, 2005, 337(1): 149-153.
- [40] Wang C K, Hu S H, Martin J L, *et al.* Combined X-ray and NMR analysis of the stability of the cyclotide cystine knot fold that underpins its insecticidal activity and potential use as a drug scaffold [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(16): 10672-10683.
- [41] Huang Y H, Colgrave M L, Daly N L, *et al.* The biological activity of the prototypic cyclotide kalata b1 is modulated by the formation of multimeric pores [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(31): 20699-20707.
- [42] Colgrave M L, Craik D J. Thermal, chemical, and enzymatic stability of the cyclotide kalata B1: The importance of the cyclic cystine knot [J]. *Biochemistry*, 2004, 43(20): 5965-5975.
- [43] Daly N L, Gustafson K R, Craik D J. The role of the cyclic peptide backbone in the anti-HIV activity of the cyclotide kalata B1 [J]. *FEBS Lett*, 2004, 574(1/2/3): 69-72.
- [44] Ireland D C, Wang C K, Wilson J A, *et al.* Cyclotides as natural anti-HIV agents [J]. *Biopolymers*, 2008, 90(1): 51-60.
- [45] Nguyen G K, Lim W H, Nguyen P Q, *et al.* Novel cyclotides and uncyclotides with highly shortened precursors from *Chassalia chartacea* and effects of methionine oxidation on bioactivities [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(21): 17598-17607.
- [46] Chen B, Colgrave M L, Daly N L, *et al.* Isolation and characterization of novel cyclotides from *Viola* Hederaceae: Solution structure and anti-HIV activity of vhl-1, a leaf-specific expressed cyclotide [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(23): 22395-22405.
- [47] Abdul Ghani H, Henriques S T, Huang Y H, *et al.* Structural and functional characterization of chimeric cyclotides from the Möbius and trypsin inhibitor subfamilies [J]. *Biopolymers*, 2017, 108(1): e22927.
- [48] Weidmann J, Craik D J. Discovery, structure, function, and applications of cyclotides: Circular proteins from plants [J]. *J Exp Bot*, 2016, 67(16): 4801-4812.
- [49] Herrmann A, Svängård E, Claeson P, *et al.* Key role of glutamic acid for the cytotoxic activity of the cyclotide cycloviolacin O2 [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63(2): 235-245.
- [50] Göransson U, Herrmann A, Burman R, *et al.* The conserved glu in the cyclotide cycloviolacin O2 has a key structural role [J]. *Chem Bio Chem*, 2009, 10(14): 2354-2360.
- [51] Wang C K L, Clark R J, Harvey P J, *et al.* The role of conserved glu residue on cyclotide stability and activity: A structural and functional study of kalata B12, a naturally occurring glu to asp mutant [J]. *Biochemistry*, 2011, 50(19): 4077-4086.
- [52] Präniting M, Lööv C, Burman R, *et al.* The cyclotide cycloviolacin O2 from *Viola odorata* has potent bactericidal activity against gram-negative bacteria [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(9): 1964-1971.
- [53] Troeira Henriques S, Craik D J. Cyclotide structure and function: The role of membrane binding and permeation [J]. *Biochemistry*, 2017, 56(5): 669-682.
- [54] Henriques S T, Huang Y H, Chaousis S, *et al.* The prototypic cyclotide kalata B1 has a unique mechanism of entering cells [J]. *Chem Biol*, 2015, 22(8): 1087-1097.
- [55] Henriques S T, Huang Y H, Rosengren K J, *et al.* Decoding the membrane activity of the cyclotide kalata B1: The importance of phosphatidylethanolamine phospholipids and lipid organization on hemolytic and anti-HIV activities [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(27): 24231-24241.
- [56] Shenkarev Z O, Balandin S V, Trunov K I, *et al.* Molecular mechanism of action of β -hairpin antimicrobial peptide arenicin: Oligomeric structure in dodecylphosphocholine micelles and pore formation in planar lipid bilayers [J]. *Biochemistry*, 2011, 50(28): 6255-6265.
- [57] Gustafson K R, Sowder R C, Henderson L E, *et al.* Circulins A and B. Novel human immunodeficiency virus (HIV)-inhibitory macrocyclic peptides from the tropical tree *Chassalia parvifolia* [J]. *J Am Chem Soc*, 1994, 116(20): 9337-9338.
- [58] Hallock Y F, Sowder R C, Pannell L K, *et al.* Cycloviolins A-D, anti-HIV macrocyclic peptides from *Leonia cymosa* [J]. *J Org Chem*, 2000, 65(1): 124-128.
- [59] Daly N L, Clark R J, Plan M R, *et al.* Kalata B8, a novel antiviral circular protein, exhibits conformational flexibility in the cystine knot motif [J]. *Biochem J*, 2006, 393(Pt 3):

- 619-626.
- [60] Svängård E, Göransson U, Hocaoglu Z, *et al.* Cytotoxic cyclotides from *Viola tricolor* [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67(2): 144-147.
- [61] Gerlach S L, Yeshak M, Göransson U, *et al.* Cycloviolacin O2 (C₂O₂) suppresses productive infection and augments the antiviral efficacy of nelfinavir in HIV-1 infected monocytic cells [J]. *Biopolymers*, 2013, 100(5): 471-479.
- [62] Bokesch H R, Pannell L K, Cochran P K, *et al.* A novel anti-HIV macrocyclic peptide from *Palicourea condensata* [J]. *J Nat Prod*, 2001, 64(2): 249-250.
- [63] Gerlach S L, Chandra P K, Roy U, *et al.* The membrane-active phytopeptide cycloviolacin O2 simultaneously targets HIV-1-infected cells and infectious viral particles to potentiate the efficacy of antiretroviral drugs [J]. *Medicines* (Basel), 2019, 6(1): E33.
- [64] Herrmann A, Burman R, Mylne J S, *et al.* The alpine violet, *Viola biflora*, is a rich source of cyclotides with potent cytotoxicity [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(4): 939-952.
- [65] Svängård E, Burman R, Gunasekera S, *et al.* Mechanism of action of cytotoxic cyclotides: Cycloviolacin O2 disrupts lipid membranes [J]. *J Nat Prod*, 2007, 70(4): 643-647.
- [66] Yeshak M Y, Burman R, Asres K, *et al.* Cyclotides from an extreme habitat: Characterization of cyclic peptides from *Viola abyssinica* of the Ethiopian Highlands [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(4): 727-731.
- [67] Wang C K, Gruber C W, Cemazar M, *et al.* Molecular grafting onto a stable framework yields novel cyclic peptides for the treatment of multiple sclerosis [J]. *ACS Chem Biol*, 2014, 9(1): 156-163.
- [68] Gerlach S L, Burman R, Bohlin L, *et al.* Isolation, characterization, and bioactivity of cyclotides from the Micronesian plant *Psychotria leptothyrsa* [J]. *J Nat Prod*, 2010, 73(7): 1207-1213.
- [69] Claeson P, Göransson U, Johansson S, *et al.* Fractionation protocol for the isolation of polypeptides from plant biomass [J]. *J Nat Prod*, 1998, 61(1): 77-81.
- [70] Nguyen G K, Zhang S, Nguyen N T, *et al.* Discovery and characterization of novel cyclotides originated from chimeric precursors consisting of albumin-1 chain and cyclotide domains in the Fabaceae family [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(27): 24275-24287.
- [71] Tang J, Wang C K, Pan X L, *et al.* Isolation and characterization of cytotoxic cyclotides from *Viola tricolor* [J]. *Peptides*, 2010, 31(8): 1434-1440.
- [72] Wong C T, Taichi M, Nishio H, *et al.* Optimal oxidative folding of the novel antimicrobial cyclotide from *Hedyotis biflora* requires high alcohol concentrations [J]. *Biochemistry*, 2011, 50(33): 7275-7283.
- [73] Göransson U, Sjögren M, Svängård E, *et al.* Reversible antifouling effect of the cyclotide cycloviolacin O2 against barnacles [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67(8): 1287-1290.
- [74] Subramanian G, Palanichamy S, Veeramani P. An eco-friendly process for prevention of biofouling [J]. *Prog Org Coat*, 2016, 99:474-479.
- [75] Yee M S L, Khiew P S, Lim S S, *et al.* Enhanced marine antifouling performance of silver-titania nanotube composites from hydrothermal processing [J]. *Colloids Surfaces A: Physicochem Eng Aspects*, 2017, 520: 701-711.
- [76] Fensterseifer I C, Silva O N, Malik U, *et al.* Effects of cyclotides against cutaneous infections caused by *Staphylococcus aureus* [J]. *Peptides*, 2015, 63: 38-42.
- [77] Colgrave M L, Kotze A C, Ireland D C, *et al.* The anthelmintic activity of the cyclotides: Natural variants with enhanced activity [J]. *Chem Bio Chem*, 2008, 9(12): 1939-1945.
- [78] Colgrave M L, Kotze A C, Kopp S, *et al.* Anthelmintic activity of cyclotides: *In vitro* studies with canine and human hookworms [J]. *Acta Trop*, 2009, 109(2): 163-166.
- [79] Gran L. Oxytotic principles of *Oldenlandia affinis* [J]. *Lloydia*, 1973, 36(2): 174-178.
- [80] Poth A G, Huang Y H, Le T T, *et al.* Pharmacokinetic characterization of kalata B1 and related therapeutics built on the cyclotide scaffold [J]. *Int J Pharm*, 2019, 565: 437-446.
- [81] Thongyoo P, Bonomelli C, Leatherbarrow R J, *et al.* Potent inhibitors of beta-tryptase and human leukocyte elastase based on the MCoTI-II scaffold [J]. *J Med Chem*, 2009, 52(20): 6197-6200.
- [82] Sommerhoff C P, Avrutina O, Schmoldt H U, *et al.* Engineered cystine knot miniproteins as potent inhibitors of human mast cell tryptase beta [J]. *J Mol Biol*, 2010, 395(1): 167-175.
- [83] Quimbar P, Malik U, Sommerhoff C P, *et al.* High-affinity cyclic peptide matriptase inhibitors [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(19): 13885-13896.

- [84] Swedberg J E, Mahatmanto T, Abdul Ghani H, *et al.* Substrate-guided design of selective FXIIa inhibitors based on the plant-derived *Momordica cochinchinensis* trypsin inhibitor-II (MCoTI-II) scaffold [J]. *J Med Chem*, 2016, 59(15): 7287-7292.
- [85] D'Souza C, Henriques S T, Wang C K, *et al.* Using the MCoTI-II cyclotide scaffold to design a stable cyclic peptide antagonist of SET, a protein overexpressed in human cancer [J]. *Biochemistry*, 2016, 55(2): 396-405.
- [86] Attah A F, Hellinger R, Sonibare M A, *et al.* Ethnobotanical survey of *Rinorea dentata* (Violaceae) used in South-Western Nigerian ethnomedicine and detection of cyclotides [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 179: 83-91.
- [87] Huang Y H, Chaousis S, Cheneval O, *et al.* Optimization of the cyclotide framework to improve cell penetration properties [J]. *Front Pharmacol*, 2015, 6: 17.
- [88] Thell K, Hellinger R, Sahin E, *et al.* Oral activity of a nature-derived cyclic peptide for the treatment of multiple sclerosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(15): 3960-3965.

[责任编辑 崔艳丽]