

新的天然免疫保护分子 SPLUNC1 的结构与功能研究进展 *

郭小芳 陈 攀 李夏雨 李小玲 李桂源 **

(中南大学肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 腭、肺及鼻咽上皮克隆(palate, lung, and nasal epithelium clone, PLUNC) 家族为一新近发现的具有宿主防御功能的蛋白质家族, 它们大多存在于呼吸道上皮与消化道上皮的表面, 在上皮组织与外界各种信号之间起着信号传递中介与信号执行分子的作用. 在迄今为止发现的人类 10 个 PLUNC 家族成员中, 我们所克隆的 NASG 基因即为这一免疫保护分子家族的成员, 对其结构与功能分析表明, 它属于 SPLUNC1 (short palate, lung, and nasal epithelium clone 1) 的全新转录本, 具有杀菌/渗透增强蛋白质结构域, 能对外来物理及化学刺激做出反应, 并具有抗微生物、清除有害化学物质、抗肿瘤等多重功效. SPLUNC1 作为上呼吸道的一种新的天然免疫保护分子, 在维持上呼吸道的正常生理活动以及抗炎杀菌抑瘤中起着重要作用.

关键词 SPLUNC1, 上呼吸道, 天然免疫保护分子

学科分类号 Q78

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00436

腭、肺及鼻咽上皮克隆(palate, lung, and nasal epithelium clone, PLUNC) 家族为一新近发现的具有宿主防御功能的蛋白质家族, 它们大多存在于呼吸道上皮与消化道上皮的表面^[1-4]. 上呼吸道和上消化道无时无刻都在直接或间接接触着各种病原微生物及有害气体. 上皮组织则主要依靠两种形式的防御体系来进行自我防卫, 即特定的天然防御系统和抗原识别的适应性免疫反应系统. 在上皮组织的表面, 覆盖着一层薄薄的由上皮组织本身所分泌的蛋白质混合物, 这些混合物能感受、结合、转运、降解及清除各种有害物质及其副产物. 如在唾液中, 就已发现至少 12 种以上的抗微生物病原体的蛋白质^[5], 它们包括有糖蛋白如黏液素(mucins)、凝集素(agglutinin)等, 酶如乳过氧化物酶(lactoperoxidase)等及酶的抑制剂, 还包括有些金属结合蛋白如转乳铁蛋白(lactoferrin)及一些能直接影响细菌细胞膜的肽类物质如防御素(defensins)等. PLUNC 样蛋白质家族即为上皮组织防御混合物的新成员^[5-7]. 这些混合物不但能对外来信号进行检测与传输, 而且还能将所接受信号放大或缩小. 迄今为止已经在人类发现了 10 个 PLUNC 家族成员,

其中, SPLUNC1 (short palate, lung, and nasal epithelium clone 1) 的免疫保护作用及在呼吸道肿瘤中的功能尤其引人关注, 但作为一个新的免疫防御分子目前国内外尚未对其进行总结和概述, 本文将对 SPLUNC1 的蛋白质结构与功能研究进展做一综述.

1 SPLUNC1 蛋白的发现及其家族成员

我室 Zhang 等^[8]采用成人鼻咽上皮组织 cDNA 制备检测子, 以成人食管、肺、肝、心、胃、脾、肌肉、肾和皮肤 cDNA 制备驱赶子进行抑制性消减杂交, 并通过多组织 cDNA array 表达鉴定所克隆出的鼻咽组织相关的特异性表达基因(nasopharynx associated specific gene, NASG). 对其结构与功能分析表明它属于 SPLUNC1 的全新转录本. SPLUNC1 基因 cDNA 序列全长 771 bp, 编

* 国家自然科学基金资助项目(81101509, 81171930).

** 通讯联系人.

Tel: 0731-84805383, E-mail: Ligy@xysm.net

收稿日期: 2011-09-27, 接受日期: 2011-11-21

码 256 个氨基酸, GenBank 登录号为 AF439448.

SPLUNC1 为 PLUNC (palate, lung and nasal epithelium clone, PLUNC) 家族成员之一, 该家族目前在人类已有 10 个成员, 分布在人类 20 号染色体大约 300 kb 的狭窄区域 20q11^[8]. 所有物种中 PLUNC 至少包含 14 个家族成员, 它们定位在人的 20 号染色体、大鼠的 3 号染色体和小鼠的 2 号染色体^[9]. 由于它们由不同的研究小组克隆, 其命名也各异, 甚至同一个基因有多个不同的转录本也有多种命名^[10], 如 SPLUNC1, 根据其非翻译区的不同, 就有 NASG、Spurt、lunx 等不同的转录本. 我们曾分析了 NASG 基因 3' 端的 UTR 序列, 发现 NASG 在鼻咽组织中就存在有 3 种不同的非翻译序列^[11].

根据其组织来源, Bingle 等^[12]将这些基因的名称统一为 PLUNC, 并按照它们的大小分为两组: 一组为长片段的 PLUNC (long plunc, LPLUNC), 包括 484 个氨基酸的 LPLUNC1、458 个氨基酸的 LPLUNC2、463 个氨基酸的 LPLUNC3、大于 469 个氨基酸的 LPLUNC4, 它们都含有 15 个或 16 个外显子; 另一组为短片段的 PLUNC (short plunc, SPLUNC), 包括 256 个氨基酸的 SPLUNC1、249 个氨基酸的 SPLUNC2 及 253 个氨基酸的 SPLUNC3, 它们包含有 9 个外显子. 近来在这一区域克隆的 BASE 也可归纳为 SPLUNC 家族成员^[13].

在 PLUNC 家族中各个成员的内含子大小和间距均为高度保守, 提示该家族共同产生于过去的某些基因进化事件中^[14]. 此外, PLUNC 家族在基因结构方面具有一个显著特点: 人类 PLUNC 所有家族成员都集中位于 20 号染色体上不到 300 kb 的一段狭窄区域; 小鼠的 PLUNC 家族集中在 2 号染色体上一段不到 400 kb 的区域. 而已知的其他基因家族大部分分散于不同的染色体并不会如此集中,

说明在漫长的进化过程中 PLUNC 家族并没有因为染色体断裂而改组. 人类和小鼠 PLUNC 家族成员的基因在染色体上如此集中的现象有利于我们诠释两物种进化过程中的亲缘关系和进一步的基因功能研究.

2 SPLUNC1 蛋白的结构特征及其表达的组织特异性

通过对 SPLUNC1 进行氨基酸的组成、极性、抗原性、亲水性分析, 发现 SPLUNC1 蛋白的 N 端含有一 19 个氨基酸的信号肽, 表明 SPLUNC1 蛋白可能为一种分泌性的蛋白质. 随后研究人员在鼻咽灌洗液^[15]和唾液中^[16-17]检测到了 SPLUNC1. 并且通过培养人原代气道上皮细胞发现 SPLUNC1 的表达量较多, 占到了上皮内层液体中蛋白质总量的 10%^[18]. 进一步研究证实, SPLUNC1 可由鼻中隔、鼻甲筛骨、鼻咽、气管和肺的气道黏膜组织产生^[2, 16], Bingle 等^[19-20]更精确地定位了 SPLUNC1 主要由黏液细胞和黏膜下层腺体产生, 但是人气道的杯状细胞不表达 SPLUNC1.

由于准确的蛋白质三维结构有待于通过晶体衍射等实验确定, SPLUNC1 的三维结构目前只能通过生物学信息预测, 利用 3DPSSM 三维结构预测软件对 SPLUNC1 蛋白的三维结构进行预测并与已知的蛋白质三维结构数据库匹配, 发现它包含一个杀菌/细菌渗透增强蛋白结构域 (bactericidal permeability increasing protein, BPI), 其三维折叠结构与 BPI 折叠极为相似^[21] (图 1). BPI 蛋白为一功能与结构研究得较为清楚的蛋白质, 晶体衍射分析表明, 其 N 端的三维立体结构形成一个疏水的桶状口袋, 该桶状口袋能与细菌细胞壁上的脂多糖特异性地结合, 从而具有中和内毒素及直接杀菌作用^[22].

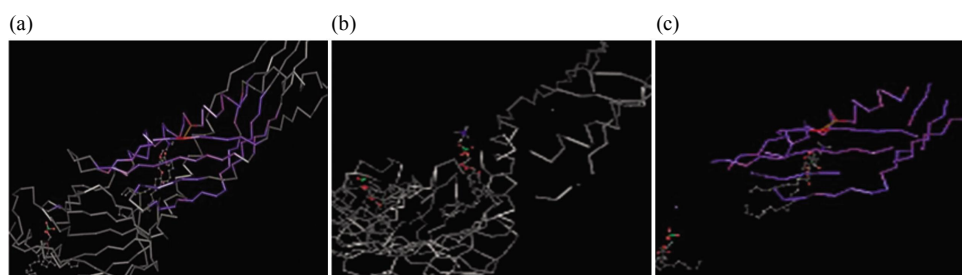


Fig. 1 Classification and prediction of the three-dimentional structure of SPLUNC1 by 3D PSSM

图 1 利用 3D PSSM 软件预测 SPLUNC1 蛋白的三维结构

(a) BPI 的三维结构. (b) BPI 三维结构与 SPLUNC1 不同的部分. (c) BPI 三维结构与 SPLUNC1 相同的 N 端桶状结构.

(图片引自: 周后德. 固有免疫分泌性蛋白 SPLUNC1 的鉴定及其参与鼻咽癌细胞凋亡与分化的作用机制研究. 中南大学博士学位论文)

通过 SPLUNC1 的组织表达谱分析发现, SPLUNC1 在气管、鼻咽组织中有较高水平的表达, 其次为唾液腺和肺, 在其他组织中未见明显表达^[23]. 同时研究表明, 不同物种间 SPLUNC1 的表达也稍有不同. 在小鼠中, SPLUNC1 表达于鼻、上呼吸道及胸腺, 而在大鼠中则表达于鼻咽部、肺、胸腺及唾液腺等区域. 通过将 SPLUNC1 基因与绿色荧光蛋白相连进行细胞内定位, 发现荧光信号均匀分布于胞浆及胞核内^[24]. SPLUNC1 分别在呼吸道上皮的不同部位特异性表达, 并以分泌蛋白的形式进入鼻咽分泌物或唾液中, 必将成为气道上皮细胞抗病原菌的第一道防线, 说明其可能具有抗微生物、清除有害化学物质、抗肿瘤等多重功效.

3 SPLUNC1 的潜在功能

3.1 SPLUNC1 的免疫防御作用

3.1.1 SPLUNC1 通过其 BPI 结构域发挥抗炎抑菌作用.

SPLUNC1 含有一个 BPI 结构域, BPI 能与革兰氏阴性细菌细胞壁上的脂多糖(内毒素)特异性地结合, SPLUNC1 是否也具有相似的功能呢? 研究显示 SPLUNC1 也具有潜在的结合细菌脂多糖的功能^[15]. 转染 SPLUNC1 基因的细胞培养上清能显著抑制绿脓杆菌在 LB 软琼脂板上形成集落; 体外实验也表明 SPLUNC1 能与细菌脂多糖结合, 且鼻咽癌细胞系 HNE1 经转染 SPLUNC1 后细菌脂多糖摄取明显增加, 说明重组的 SPLUNC1 蛋白能经转染细胞分泌到培养上清液中并具有结合细菌脂多糖, 以及杀灭或抑制上呼吸道绿脓杆菌的功能^[25]. Chu 等^[26]通过细胞实验和小鼠实验研究显示, 正常人和小鼠有大量气道上皮细胞表达高水平的 SPLUNC1 且支原体感染能增加 SPLUNC1 的表达, 通过使用重组蛋白过表达 SPLUNC1 发现, SPLUNC1 蛋白能抑制支原体的生长并能抑制支原体诱导的 IL-8 的产生, 但过敏性炎症包括 Th2 型细胞因子如 IL-13 却能明显降低 SPLUNC1 的表达, 导致支原体持续感染^[27]. 最近通过 SPLUNC1 基因敲除小鼠证实, 与野生型小鼠相比, SPLUNC1 敲除后小鼠感染支原体以及炎症细胞的表达都会增加, 且 SPLUNC1 缺陷会导致中性粒细胞活性受损; 相反, 如果在小鼠呼吸道上皮细胞过表达人 SPLUNC1 能减少支原体的感染^[28]. 此外, 还有调查显示, 感染呼吸道合胞病毒能让婴幼儿呼吸道的 SPLUNC1 表达降低, 由此增加肺炎的发生几率^[29].

SPLUNC1 还能与纳米细菌结合^[30]. 纳米细菌为一种近年来发现的新型微生物. 它是芬兰科学家 Ciftcioglu 等进行哺乳动物细胞培养时发现的一种微生物, 后来 Kajander 等^[31-32]正式将这种原核微生物命名为纳米细菌. 纳米细菌表面也是由类似革兰氏阴性细菌的脂多糖所组成, 有学者甚至把纳米细菌也归纳为革兰氏阴性细菌^[33]. 研究表明, 纳米细菌能感染人体绝大多数细胞并使机体致病. 细胞感染纳米细菌后, 常发生细胞内外钙盐沉积, 被感染的细胞出现核变性、核形态改变或细胞溶解^[34-35]. SPLUNC1 蛋白可能通过与纳米细菌的脂多糖结合, 而起到消灭纳米细菌或传导纳米细菌所发出的信号的作用, 这也是 SPLUNC1 蛋白作为天然免疫防御分子的功能之一.

3.1.2 SPLUNC1 通过调节钠离子通道蛋白(ENaC)影响吸入病原菌从气道清除.

近三年人们发现, SPLUNC1 为一多功能的蛋白质, 它除了通过 BPI 结构域发挥作用外, 还能通过影响钠离子通道蛋白(ENaC)来维持气道表面液体体积, 从而抵抗外界微生物的感染. ENaC 为气道钠离子(Na^+)吸收的限制性步骤^[36-38]. 如果通过 ENaC 吸收较多的 Na^+ 将导致黏液干燥以及黏液停滞, 意味着气道对吸入病原菌的清除将受到阻止^[39-41]. 此外, 过表达 ENaC 的转基因鼠会发生 Na^+ 高吸收、黏液体积减少以及炎症, 因此也证实了 ENaC 与慢性肺疾病的发生存在直接的联系^[42]. ENaC 在传送 Na^+ 前需要被蛋白酶裂解才能发挥作用, 这些蛋白酶包括细胞外的通道激活蛋白酶(CAPs)或细胞内的弗林型蛋白酶, 还能被外源性丝氨酸蛋白酶如胰岛素激活^[43-46]. 最近研究者使用无偏倚的蛋白质组来寻找在气道表面液体中能与丝氨酸蛋白酶相互作用的蛋白质时鉴定出 SPLUNC1 为 ENaC 的调节者, 同时发现, 在非洲爪蟾卵细胞和人支气管上皮细胞中 SPLUNC1 并不是通过抑制蛋白酶的活性而是通过与 ENaC 结合, 从而阻止其被蛋白酶裂解并抑制 ENaC 通道电流^[47]. 进一步研究显示 SPLUNC1 能减少 ENaC 嵌入细胞膜的数量, 因此能减少基底部 ENaC 的活性和可用于蛋白酶水解切割的 ENaC 的数量^[48]. SPLUNC1 与 ENaC 绑定并影响其被裂解的机制有待进一步阐明, 由于 ENaC 包含 α , β 和 γ 三个单独的亚基, 因此目前推测 SPLUNC1 能与 α , β , γ ENaC 形成大分子复合物从而发挥作用.

SPLUNC1 除了在上呼吸道能通过维持黏液体

积发挥其抑菌的作用,在中耳也能发挥此作用从而保护中耳^[49].研究证实在中耳通过表达适当的 SPLUNC1 能够有效地维持黏膜液体体积,从而能够促进黏膜纤毛将微生物从中耳清除^[50].

3.1.3 SPLUNC1 通过与 TLRs 相互作用发挥宿主防御功能.大量研究显示 Toll-like receptors (TLRs) 信号通路能抵抗各种病原菌包括支原体从而发挥其重要的宿主防御功能^[51].迄今为止也已在人类发现 10 种不同的 TLRs.其中 TLR-2 和 TLR-4 已经明确能在控制细菌感染中发挥重要作用^[52].SPLUNC1 在发挥宿主防御功能时与 TLRs 之间是否存在相互作用值得探讨.已有研究证实 TLR-2 参与了调节 SPLUNC1 的表达.研究发现,TLR-2 缺陷鼠在支原体感染时 SPLUNC1 的表达较野生型小鼠减少^[26],且在细胞水平证实支原体和 TLR-2 的配体 Pam3CSK4 均能以一种剂量依赖的方式增加 SPLUNC1 mRNA 的表达,但在用支原体感染或 Pam3CSK4 处理 RNA 干扰 TLR-2 之后的正常人支气管上皮细胞, SPLUNC1 的表达却明显减少^[52].最近又证实 TLR-2 是通过介导 MAPK/AP-1 通路的激活来上调 SPLUNC1 的表达^[53].TLR-4 与 SPLUNC1 之间是否存在相互作用尚未见报道.TLRs 与 SPLUNC1 之间的相互作用值得我们更进一步研究和探讨.

3.2 SPLUNC1 为候选的抑癌基因

由于 SPLUNC1 的组织定位研究显示, SPLUNC1 主要表达在口腔、鼻腔、鼻咽、气管等上呼吸道上皮组织,推测 SPLUNC1 的表达可能会与呼吸道肿瘤的发生发展密切相关.迄今为止研究较多的为 SPLUNC1 与鼻咽癌发生发展的关系.姚开泰院士领导的课题小组对 SPLUNC1 基因的多态性与鼻咽癌的易感性研究发现, SPLUNC1 是一个鼻咽癌发病的遗传风险因子^[54].本研究室通过全基因组表达谱芯片及大样本组织芯片证实 SPLUNC1 在鼻咽癌组织中显著下调,提示 SPLUNC1 与鼻咽癌的发生发展呈负相关.细胞水平的研究显示, SPLUNC1 具有抑制鼻咽癌细胞系 HNE1 细胞存活的能力,能诱导 HNE1 细胞凋亡,还能明显抑制 HNE1 在裸鼠体内形成移植瘤.此外,还发现 SPLUNC1 能促进与鼻咽癌发生密切相关的病毒 EBV 及其转化细胞的裂解,抑制 EBV 编码潜伏膜蛋白 1 (latent membrane protein 1, LMP1) 基因的表达. SPLUNC1 具有潜在抑癌基因的功能.

MicroRNAs(miRNAs)是由约 22 个核苷酸组成

的非编码单链 RNAs, miRNAs 调控是近年来发现的一种新颖基因表达调控方式.研究发现, miR-141 在鼻咽癌中表达上调并参与了鼻咽癌的基因调控网络,它能够通过调控某些重要的抑癌基因 PTEN 从而参与鼻咽癌的发生发展^[55].众所周知, PTEN 是 AKT 信号转导通路的重要负调控分子,是迄今发现的第一个具有磷酸酶活性的抑癌基因,大量的研究已经证明 PTEN 主要通过使 3, 4, 5 三磷酸脂酰肌醇(PIP3)去磷酸化,达到阻止细胞生长和促进细胞凋亡的目的. PIP3 则通过蛋白激酶 B (PKB/AKT)促进细胞进入分裂周期,抑制细胞凋亡,因此癌组织中经常存在 PI3K 通路的失调或激活^[56-58]. PTEN 与 PI3K/AKT 信号通路在鼻咽癌中的相关性也已有大量研究证实: Liu 等^[59-60]和本室 Fan 等^[61]的研究结果都表明 PTEN 在鼻咽癌组织中低表达而在正常鼻咽组织中呈强阳性表达;还有研究者证实在鼻咽癌组织中 PTEN 的表达与 PI3K 的表达强度呈负相关^[62];同时在鼻咽癌细胞系中也证实 PI3K/AKT 信号通路参与了鼻咽癌的发生发展且激活 AKT 信号通路能促进鼻咽癌细胞增殖^[63-64].说明 PTEN 的表达下调和 PI3K/Akt 信号通路的激活在鼻咽癌的发生发展中起重要的作用.

miRNA 芯片和细胞实验证实 SPLUNC1 能下调 miR-141 的表达^[55],说明 SPLUNC1 能通过 miR-141 调控 PTEN/AKT 这条重要的信号通路发挥其抑癌基因的作用.此外,转录因子 BRD3 以及 UBAP1 等也为 miR-141 的靶基因,故 SPLUNC1 通过 miRNA-141 也能影响这些转录因子的表达从而在鼻咽癌的发生发展中起到作用.

除了鼻咽癌,目前较多文献也报道 SPLUNC1 可以作为非小细胞肺癌^[65-67]和胃肝样腺瘤^[68-69]的分子标志物,但其是否在这些肿瘤中发挥抑癌作用以及相关机制尚未见阐明.

通过以上综述可以知道: a. SPLUNC1 蛋白具有 BPI 样的三维折叠,通过该结构域, SPLUNC1 能结合脂多糖并可抑制细菌的生长; b. SPLUNC1 蛋白能通过维持呼吸道上皮液体体积促进外界病原菌的清除; c. SPLUNC1 与 TLRs 家族之间也存在相互作用; d. SPLUNC1 蛋白可能与肿瘤的发生、发展及转移有关.但是 SPLUNC1 与脂多糖结合后如何发挥作用? 其是否与 ENaC 结合形成大分子复合物从而起到维持液体体积的作用? 其参与肿瘤发生发展的分子机制还存在哪些重要的信号通路和信号分子? 这些疑问均有待进一步的科学实验来阐明.

参 考 文 献

- [1] Weston W M, LeClair E E, Trzyna W, *et al.* Differential display identification of plunc, a novel gene expressed in embryonic palate, nasal epithelium, and adult lung. *J Biol Chem*, 1999, **274** (19): 13698–13703
- [2] Bingle C D, Bingle L. Characterisation of the human plunc gene, a gene product with an upper airways and nasopharyngeal restricted expression pattern. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1493**(3): 363–367
- [3] LeClair E E. Four reasons to consider a novel class of innate immune molecules in the oral epithelium. *J Dent Res*, 2003, **82**(12): 944–950
- [4] Bingle C D, Gorr S U. Host defense in oral and airway epithelia: chromosome 20 contributes a new protein family. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, **36**(11): 2144–2152
- [5] Zhang B, Nie X, Xiao B, *et al.* Identification of tissue-specific genes in nasopharyngeal epithelial tissue and differentially expressed genes in nasopharyngeal carcinoma by suppression subtractive hybridization and cDNA microarray. *Genes Chromosomes Cancer*, 2003, **38**(1): 80–90
- [6] Weston W M, LeClair E E, Trzyna W, *et al.* Differential display identification of plunc, a novel gene expressed in embryonic palate, nasal epithelium, and adult lung. *J Biol Chem*, 1999, **274** (19): 13698–13703
- [7] Sung Y K, Moon C, Yoo J Y, *et al.* Plunc, a member of the secretory gland protein family, is up-regulated in nasal respiratory epithelium after olfactory bulbectomy. *J Biol Chem*, 2002, **277**(15): 12762–12769
- [8] Ghafouri B, Stahlbom B, Tagesson C, *et al.* Newly identified proteins in human nasal lavage fluid from non-smokers and smokers using two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting. *Proteomics*, 2002(1): 112–120
- [9] Bingle C D, Craven C J. Comparative analysis of the PLUNC (palate, lung and nasal epithelium clone) protein families. *Biochem Soc Trans*, 2003, **31**(Pt4): 806–809
- [10] Wheeler T T, Haigh B J, McCracken J Y, *et al.* The BSP30 salivary proteins from cattle, LUNX/ PLUNC and von Ebner's minor salivary gland protein are members of the PSP/ LBP superfamily of proteins. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1579**(2–3): 92–100
- [11] 张必成, 朱诗国, 向娟娟, 等. 鼻咽癌表达下调基因 NASG 3'UTR 可变剪接分析及其在多种肿瘤中表达. *癌症*, 2003, **22**(5): 477–480
Zhang B C, Zhu S G, Xiang J J, *et al.* *Chin J Cancer*, 2003, **22**(5): 477–480
- [12] Bingle C D, Craven C J. PLUNC: a novel family of candidate host defence proteins expressed in the upper airways and nasopharynx. *Hum Mol Genet*, 2002, **11**(8): 937–943
- [13] Egland K A, Vincent J J, Strausberg R, *et al.* Discovery of the breast cancer gene BASE using a molecular approach to enrich for genes encoding membrane and secreted proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(3): 1099–1104
- [14] Bingle C D, Leclair E E, Havard S, *et al.* Phylogenetic and evolutionary analysis of the PLUNC gene family. *Protein Sci*, 2004, **13**(2): 422–430
- [15] Ghafouri B, Kihlstrom E, Stahlbom B, *et al.* PLUNC (palate, lung and nasal epithelial clone) proteins in human nasal lavage fluid. *Biochem Soc Trans*, 2003, **31**(Pt4): 810–814
- [16] Di Y P, Harper R, Zhao Y, *et al.* Molecular cloning and characterization of spurt, a human novel gene that is retinoic acid-inducible and encodes a secretory protein specific in upper respiratory tracts. *J Biol Chem*, 2003, **278**(2): 1165–1173
- [17] Kohlgraf K G, Ackermann A R, Burnell K K, *et al.* Quantitation of SPLUNC1 in saliva with an xMAP particle-based antibody capture and detection immunoassay. *Archives of Oral Biology*, 2012, **57**(2): 197–204
- [18] Campos M A, Abreu A R, Nlend M C, *et al.* Purification and characterization of PLUNC from human tracheobronchial secretions. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, **30**: 184–192
- [19] Bingle L, Cross S S, High A S, *et al.* SPLUNC1 (PLUNC) is expressed in glandular tissues of the respiratory tract and in lung tumours with a glandular phenotype. *J Pathol*, 2005, **205**(4): 491–497
- [20] Bingle L, Barnes F A, Cross S S, *et al.* Differential epithelial expression of the putative innate immune molecule SPLUNC1 in cystic fibrosis. *Respir Res*, 2007, **8**: 79–89
- [21] Beamer L J. Structure of human BPI bactericidal/permeability-increasing protein and implications for related proteins. *Biochem Soc Trans*, 2003, **31**(Pt 4): 791–794
- [22] Levy O, Ooi C E, Elsbach P, *et al.* Antibacterial proteins of granulocytes differ in interaction with endotoxin: comparison of bactericidal/permeability-increasing protein, p15s, and defensins. *J Immunol*, 1995, **154**(10): 5403–5410
- [23] Zhou H D, Fan S Q, Zhao J, *et al.* Tissue distribution of the secretory protein, SPLUNC1, in the human fetus. *Histochem Cell Biol*, 2006, **125**(3): 315–324
- [24] 张必成, 吕红斌, 周后德, 等. 人鼻咽组织特异性表达基因 NASG 编码产物在细胞中的融合表达. *生命科学研究*, 2003, **7**(1): 84–88
Zhang B C, Lü H B, Zhou H D, *et al.* *Life Sci Res*, 2003, **7**(1): 84–88
- [25] Zhou H D, Li X L, Li G Y, *et al.* Effect of SPLUNC1 protein on the *Pseudomonas aeruginosa* and Epstein-Barr virus. *Mol Cell Biochem*, 2008, **309**(1–2): 191–197
- [26] Chu H W, Thaikootathil J, Rino J G, *et al.* Function and regulation of SPLUNC1 protein in mycoplasma infection and allergic inflammation. *J Immunol*, 2007, **179**(6): 3995–4002
- [27] Yeh T H, Lee S Y, Hsu W C. Expression of SPLUNC1 protein in nasal polyp epithelial cells in air-liquid interface culture treated with IL-13. *Am J Rhinol Allergy*, 2010, **24**(4): 17–20
- [28] Gally F, Di Y P, Smith S K, *et al.* SPLUNC1 promotes lung innate defense against *Mycoplasma pneumoniae* infection in mice. *Am J Pathol*, 2011, **178**(5): 2159–2167
- [29] Fornander L, Ghafouri B, Kihlström E, *et al.* Innate immunity proteins and a new truncated form of SPLUNC1 in nasopharyngeal

- aspirates from infants with respiratory syncytial virus infection. 2011, **5**(9-10): 512-522
- [30] Zhou H D, Li G Y, Yang Y X, *et al.* Intracellular co-localization of SPLUNC1 protein with nanobacteria in nasopharyngeal carcinoma epithelia HNE1 cells depended on the bactericidal permeability increasing protein domain. *Mol Immunol*, 2006, **43** (11): 1864-1871
- [31] Kajander E O, Ciftcioglu N. Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation. *Prog Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(14): 8274-8279
- [32] Kajander E O, Ciftcioglu N, Aho K, *et al.* Characteristics of nanobacteria and their possible role in stone formation. *Urol Res*, 2003, **31**(2): 47-54
- [33] Hjelle J T, Miller-Hjelle M A, Poxton I R, *et al.* Endotoxin and nanobacteria in polycystic kidney disease. *Kidney Int*, 2000, **57**(6): 2360-2374
- [34] Rahman N U, Meng M V, Stoller M L. Infections and urinary stone disease. *Curr Pharm Des*, 2003, **9**(12): 975-981
- [35] Ciftcioglu N, Miller-Hjelle M A, Hjelle J T, *et al.* Inhibition of nanobacteria by ilution method. antimicrobial drugs as measured by a modified microdilution method. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, **46**(7): 2077-2086
- [36] Rossier B C, Stutts M J. Activation of the epithelial sodium channel (ENaC) by serine proteases. *Annu Rev Physiol*, 2009, **71**: 361-379
- [37] Gaillard E A, Kota P, Gentzsch M, *et al.* Regulation of the epithelial Na⁽⁺⁾ channel and airway surface liquid volume by serine proteases. *Pflugers Arch*, 2010, **460**(1): 1-17
- [38] Pflugers A, Kunzelmann K, Mall M. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev*, 2002, **82**(1): 245-289
- [39] Knowles M R, Boucher R C. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest*, 2002, **109**(5): 571-577
- [40] Chmiel J F, Davis P B. State of the art: why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection?. *Respir Res*, 2003, **4**(1): 8
- [41] Matsui H, Grubb B R, Tarran R, *et al.* Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell*, 1998, **95**(7): 1005-1015
- [42] Mall M, Grubb B R, Harkema J R, *et al.* Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat Med*, 2004, **10**(5): 487-493
- [43] Planes C, Caughey G H. Regulation of the epithelial Nachannel by peptidases. *Curr Top Dev Biol*, 2007, **78**: 23-46
- [44] Rossier B C. The epithelial sodium channel: Activation by membrane-bound serine proteases. *Proc Am Thorac Soc*, 2004, **1**(1): 4-9
- [45] Vallet V, *et al.* An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature*, 1997, **389**: 607-610
- [46] Chraïbi A, Vallet V, Firsov D, *et al.* Protease modulation of the activity of the epithelial sodium channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol*, 1998, **111**(1): 127-138
- [47] Garcia-Caballero A, Rasmussen J E, Gaillard E, *et al.* SPLUNC1 regulates airway surface liquid volume by protecting ENaC from proteolytic cleavage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106** (27): 11412-11417
- [48] Rollins B M, Garcia-Caballero A, Stutts M J, *et al.* SPLUNC1 expression reduces surface levels of the epithelial sodium channel (ENaC) in *Xenopus laevis* oocytes. *Channels*, 2010, **4**(4): 255-259
- [49] Bakaletz L O. Otitis Media/Brogden K A, JM Guthmiller, eds. *Polymicrobial Diseases*. Washington DC: ASM Press, 2002: 259-298
- [50] Fischer M, Ehlers M. Toll-like receptors in autoimmunity. *Ann NY Acad Sci*, 2008, **1143**(1): 21-34
- [51] Markus Schnare, Martin Röllinghoff, Salman Qureshi. Toll-Like Receptors: Sentinels of Host Defence against Bacterial Infection. *Int Arch Allergy Immunol*, 2006, **139**(1): 75-85
- [52] Chu H W, Gally F, Thaikootathil J, *et al.* SPLUNC1 regulation in airway epithelial cells: role of toll-like receptor 2 signaling. *Respiratory Research*, 2010, **11**(1): 155-165
- [53] Thaikootathil J, Chu H W. MAPK/AP-1 activation mediates TLR2 agonist-induced SPLUNC1 expression in human lung epithelial cells. *Mol Immunol*, 2011, **49**(3): 415-422
- [54] He Y, Zhou G, Zhai Y. Association of PLUNC gene polymorphisms with susceptibility to nasopharyngeal carcinoma in a Chinese population. *J Med Genet*, 2005, **42**(2): 172-176
- [55] Zhang L, Deng T, Li X, *et al.* microRNA-141 is involved in a nasopharyngeal carcinoma-related genes network. *Carcinogenesis*, 2010, **31**(4): 559-566
- [56] Yuan T L, Cantley L C. PI3K pathway alterations in cancer: Variations on a theme. *Oncogene*, 2008, **27**(41): 5497-5510
- [57] Carracedo A, Pandolfi PP. The PTEN-PI3K pathway: Of feedbacks and cross-talks. *Oncogene*, 2008, **27**(41): 5527-5541
- [58] Samuels Y, Ericson K. Oncogenic PI3K and its role in cancer. *Curr Opin Oncol*, 2006, **18**(1): 77-82
- [59] Liu Y Y, Geng X L, Zheng X L, *et al.* Expression and clinical significance of PTEN and Bcl-2 in nasopharyngeal carcinoma tissue. *Cancer Prevention and Control Research*, 2009, **36**(2): 115-118
- [60] 谷化平. Survivin 和 PTEN 在鼻咽癌组织表达及其临床意义. *青岛大学医学院学报*, 2008, **44**(4): 331-334
- Gu H P. *Acta Acad Medic Qingdao*, 2008, **44**(4): 331-334
- [61] Fan S Q, Ma J, Zhou J, *et al.* Differential expression of Epstein-Barr virus-encoded RNA and several tumor-related genes in various types of nasopharyngeal epithelial lesions and nasopharyngeal carcinoma using tissue microarray analysis. *Hum Pathol*, 2006, **37**(5): 593-605
- [62] 陈英杰, 刘 健, 陶雅君, 等. PTEN 和 PI3K 在鼻咽癌中的表达及意义. *中国老年学杂志*, 2008, **28**(12): 1093-1094
- Chen Y J, Liu J, Tau Y J, *et al.* *Chin J Gerontology*, 2008, **28**(12): 1093-1094

- [63] Yip W K, Leong V C, Abdullah M A, *et al.* Overexpression of phospho-Akt correlates with phosphorylation of EGF receptor, FKHR and BAD in nasopharyngeal carcinoma. *Oncol Rep*, 2008, **19**(2): 319-328
- [64] Mei Y P, Zhou J M, Wang Y, *et al.* Silencing of LMP1 induces cell cycle arrest and enhances chemosensitivity through inhibition of AKT signaling pathway in EBV-positive nasopharyngeal carcinoma cells. *Cell Cycle*, 2007, **6**(11): 1379-1385
- [65] Benlloch S, Galbis-Caravajal J M, Alenda C, *et al.* Expression of molecular markers in mediastinal nodes from resected stage I non-small-cell lung cancer (NSCLC): prognostic impact and potential role as markers of occult micrometastases. *Ann Oncol*, 2009, **20**(1): 91-97
- [66] 王维博, 崔言刚, 姚舒洋. 肺特异性 X 蛋白角蛋白 19 及癌胚抗原基因在非小细胞肺癌淋巴结微转移中的比较. *中华肿瘤杂志*, 2008, **30**(2): 121-124
- Wang W B, Cui Y G, Yao S Y. *Chin J Oncology*, 2008, **30**(2): 121-124
- [67] Cheng M, Chen Y, Yu X, *et al.* Diagnostic utility of LunX mRNA in peripheral blood and pleural fluid in patients with primary non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, 2008, **31**(8): 156
- [68] Sentani K, Oue N, Sakamoto N, *et al.* Gene expression profiling with microarray and SAGE identifies PLUNC as a marker for hepatoid adenocarcinoma of the stomach. *Mod Pathol*, 2008, **21**(4): 464-475
- [69] Yasui W, Oue N, Sentani K, *et al.* Transcriptome dissection of gastric cancer: identification of novel diagnostic and therapeutic targets from pathology specimens. *Pathol Int*, 2009, **59**(3): 121-136

The Structure and Function of SPLUNC1: Novel Class of Innate Immune Protective Molecules*

GUO Xiao-Fang, CHEN Pan, LI Xia-Yu, LI Xiao-Ling, LI Gui-Yuan**

(Cancer Research Institute, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract Epithelial surfaces of the upper alimentary tract and upper respiratory tract are swarming with protein compounds that protect itself from many kinds of damages. These compounds are consisted of innate immune molecules. From the structure and functional prediction, the new member is added, PLUNC family, to the compounds. They are including at least ten members. SPLUNC1 (short palate, lung, and nasal epithelium clone 1) is isolated from human nasopharyngeal epithelia by suppression subtractive hybridization (SSH) and cDNA microarray analysis in our lab. SPLUNC1 is a gene transcript of the PLUNC gene family and also is a member of the BPI (bactericidal permeability increasing protein)/LBP (lipopolysaccharide-binding protein) family with putative bactericidal/bacteriostatic functions. They may function to protect epithelial surfaces from pathogenic micro-organism and harmful gases, the wrong expression will lead to host tissues destruction and tumorigenesis.

Key words SPLUNC1, upper airway, innate immune protective molecules

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00436

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81101509, 81171930).

**Corresponding author.

Tel: 86-731-84805383, E-mail: Ligy@xysm.net

Received: September 27, 2011 Accepted: November 21, 2011