

哺乳动物防御素的研究进展及其应用前景

陈颖¹⁾ 葛毅强²⁾ 张利明¹⁾ 李文彬¹⁾ 孙勇如^{1)*}
(¹⁾中国科学院遗传研究所, 北京 100101; ²⁾中国农业大学食品学院, 北京 100094)

摘要 防御素是生物界广泛存在的一类具微生物抗性的低分子短肽, 其中哺乳动物防御素的抗性谱最为广泛, 具有很高的应用潜力. 概述了哺乳动物防御素的组成分布、立体结构、基因表达调控、抗菌谱等的国内外研究进展, 并展望了其在医学和植物抗病基因工程中的应用前景.

关键词 防御素, 哺乳动物, 研究进展

学科分类号 Q503

生物机体具有内在的防御系统, 在病原体的感染诱导下, 生物机体自身会产生一系列拮抗物质, 如一些低分子质量的次生代谢产物、酶或病程相关蛋白, 或是一些小于 100 个氨基酸的低分子短肽, 以阻止病害的传播和病原微生物的进一步入侵.

防御素 (defensins) 正是这类低分子短肽中的一个家族, 它广泛分布于动物、植物和昆虫体内, 与其他抗微生物肽相比, 防御素具有特殊的抗性机理, 它主要作用于病原微生物的细胞膜, 使病原微生物不易对其产生抗性. 而其他抗微生物肽主要作用于微生物的酶, 酶基因的突变就会使靶细胞对其产生抗性, 因此防御素具有其他抗微生物肽无可比拟的优势. 此外防御素还具有十分广泛的抗菌谱, 体外抑菌实验表明防御素可以抗细菌、真菌、被膜病毒等多种微生物, 尤其是哺乳动物防御素除了对细菌、真菌、被膜病毒有毒杀作用外, 还对支原体、衣原体、螺旋体及一些恶性细胞 (如肿瘤细胞) 和爱滋病毒有杀伤作用, 具有更为广泛的抗菌谱. 因而无论是在医药开发或是植物抗病育种中, 哺乳动物防御素都具有更广泛的应用前景和更高的应用价值, 必将会受到更大的关注.

1 哺乳动物防御素的含量与分布

1.1 α -防御素

α -防御素最初是从豚鼠和兔子的多形核嗜中性细胞中分离出来的, 随后又在小鼠等多种哺乳动物的许多器官和组织中发现了 α -防御素 (表 1). 在人的嗜中性细胞中发现了 4 种 α -防御素, 其中 HNP1、HNP2、HNP3 约占细胞总蛋白含量的 5% ~ 7%, 占细胞总防御素的 99%, 而 HNP4 的含量则是其他三种防御素的 1/100^[1]. 新近研究发现在发炎的口腔唾液、结膜、泪腺及眼泪中均含有大量

的 HNP-1, 2, 3^[2,3]. 在兔的嗜中性细胞中有 NP-1、NP-2、NP-3a、NP-3b、NP-4、NP-5 六种防御素, 其总量占细胞蛋白质总量的 15% ~ 20%, 在兔的巨噬细胞中含有防御素 MCP-1、MCP-2, 但其表达因组织起源及动物年龄的不同而不同^[1]. 因此推测 MCP 在巨噬细胞中的合成受一种组织特异信号的调控, 其表达具有组织特异性和时空性. 此外, α -防御素还广泛存在于人、鼠的小肠潘氏细胞.

1.2 β -防御素

β -防御素是 Diamond 等^[4]首次在牛的气管粘膜上皮细胞中发现的短肽, 命名为 TAP (tracheal antimicrobial peptide). 后来又又在牛的粒性白细胞中发现了 13 种与 TAP 的序列高度同源, 但其 consensus 序列与 α -防御素不同的防御素, 故被命名为 β -防御素. 在牛中还发现了另外两种防御素 LAP (lingual antimicrobial peptide) 及 EBD (enteric β -defensin), 分别分布于牛舌的鳞状上皮细胞、气管、牙槽巨噬细胞及小肠细胞中^[5,6]. 人的 β -防御素 (hBD-1) 最初是在血液中发现的, 随后又在肾、尿液、宫颈粘液、下颌唾液腺、胰腺、气管、前列腺、胎盘、睾丸、胸腺及小肠细胞中都发现有防御素的表达^[7,8]. 人的第二种 β -防御素 hBP-2 是从由角蛋白产生的牛皮癣皮肤中发现的, 并由此推测 hBD-2 可能对皮肤的延伸有作用. 随后在泪腺、角膜、结膜、牙龈中都有发现^[8]. Zhang 等^[9]通过 RT-PCR 发现猪的防御素 pBD-1 mRNA 几乎是无处不在, 它广泛分布于胸腺、脾、肝脏、肾、淋巴结、膀胱、脑、睾丸、肌肉、皮肤、骨髓、心脏等器官的组织细胞中, DNA 印迹

* 通讯联系人.

Tel: 010-62892417, E-mail: yiqiangge@163.net

收稿日期: 1999-11-23, 修回日期: 2000-03-22

结果表明, 在猪舌中防御素的含量最多可达20~100 mg/L^[10]. 此外, 在鼠、羊、鸡和火鸡中也有β-防御素分布^[11-13] (表1).

表1 部分哺乳动物防御素的来源及名称

Table 1 Some mammal defensins derived from animals and their families

	名称	动物来源	分布组织
α-防御素	HNP1~ 4	人	嗜中性细胞
	NP1~ 5	兔	嗜中性细胞
	Rat NP1~ 4	小鼠	嗜中性细胞
	GPDEF1, 2	猪	嗜中性细胞
	HD5, 6	人	潘尼氏细胞
	CRYPT1~ 20	大鼠	潘尼氏细胞
	MCPI, 2	兔	泡状巨噬细胞
β-防御素	TAP	牛	气管
	LAP		舌, 气管
	EBD		肠
	BNBD4, 5		泡状巨噬细胞
	BNBD1		嗜中性细胞
	sBD-1, 2	羊	胃肠道
	hBD-1	人	肾, 唾腺, 气管
	hBD-2		皮肤及其他上皮
	mBD-1	小鼠	肾, 肺
	RBD-1, 2	大鼠	肾, 肺
	Galinacins Gal 1, 1a, 2)	鸡	嗜异组织
	THP1~ 3	火鸡	嗜异组织
	pBD-1	猪	舌, 呼吸系统, 胃肠道

2 氨基酸组成及立体结构

α-防御素由29~36个氨基酸组成, 富含精氨酸, 并含有6个保守的半胱氨酸. X射线结晶及2D核磁共振分析结果表明HNP-3为长椭圆形分子, 大小约为26×15×15, 由3个反向平行的β片状结构组成, 其高度保守的Arg5及Glu13(E13)形成了一个跨越非β片状区的盐桥^[4]. 在溶液中, HNP-3以氢键和二水分子连接成头尾相接的同型二聚体形式存在. 一般认为α-防御素具有以下结构特征: 含有一个通过3个二硫键连接的β片状结构, 三个二硫键的连接位置分别为1-6、2-4、3-5连接, 其中1-6对二硫键连接N端和C端的半胱氨酸, 并形成分子大环.

β-防御素由38~42个氨基酸组成, 与α-防御素的相同点在于二者都具阳离子并含有6个保守的半胱氨酸, 其不同点除了基本序列不同外, 还有以下三点区别: a. 二硫键的连接位置不同, 在α-防御素中, 6个半胱氨酸分是1-6, 2-4, 3-5连接, 而在α-防御素中, 则是以1-3, 2-4, 3-6方式连接(图1); b. 在β-防御素序列中部有一个保守的脯氨酸和一个甘氨酸, 而α-防御素则没有(图1); c. 二者的前体结构不同, α-防御素合成时, 由信号肽合成propeptide, 然后再形成成熟肽, 而β-防御素的信号序列和前体序列是一样的^[4].

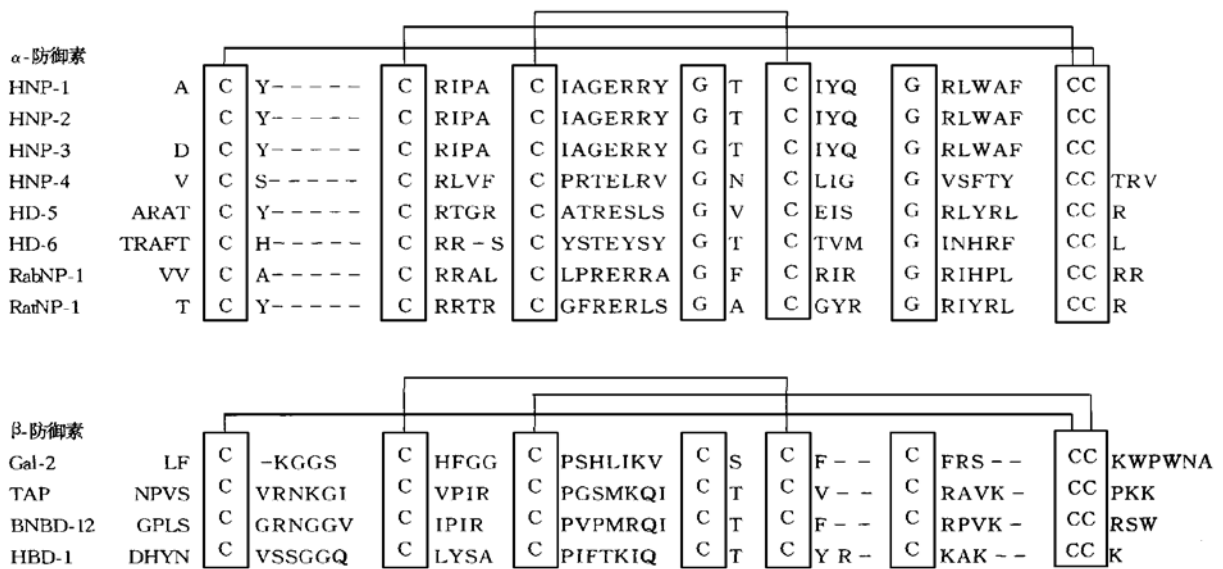


图1 几种α-防御素和β-防御素的基本结构

Fig. 1 Primary structure of representative α-defensins and β-defensins

虽然 α -防御素和 β -防御素在序列和结构上有诸多不同,但它们在水溶液中的三维结构却几乎一致,由此推测二者可能是从同一个基因经过不同的分枝进化而来的^[15].

3 哺乳动物防御素的基因结构及其表达调控

研究发现 MCP 基因中含 2 个内含子和 3 个外显子,3 个外显子各编码不同的功能团:5' 上游非翻译序列、前体肽功能团、成熟的防御素序列及 3' 端非翻译序列. HNP-1、HNP-3、NP-3、NP-3a 及豚鼠中的防御素 GNCP-2 基因也都含有 3 个外显子和 2 个内含子. 3 个外显子编码的基因产物与 MCP 基因的基本一致. 在 HNP-1 和 HNP-3 基因中第一个内含子的长度为 1 369 bp,而在 NP-3a 和 GNCP-2 基因中第一个内含子的长度分别为 1 232 bp 和 1 217 bp; 第二个内含子的长度不及第一个的一半,在 HNP-1 和 HNP-3 基因中为 588 bp,在 NP-3a 和 GNCP-2 基因中分别为 577 bp 和 561 bp. 但人小肠潘氏细胞中的 HD-5 基因的结构则与其他 α -防御素不同,它只含有 2 个外显子和 1 个内含子,其中第一个外显子编码 5' 非翻译序列及前体部分,第二个外显子编码成熟肽,内含子的长度为 980 bp,介于嗜中性细胞防御素基因的二个内含子之间.

通过对几种 α -防御素基因结构的分析表明:NP-3a 与 HNP-1 基因的相关性最为紧密,NP-3a 与 MCP-1 高度同源,HNP-1 与 GNCP-2 的相关性不如 HNP-1 与兔防御素的高.HNP-1 与 HD-5 基因的同源部分位于 HNP-1 基因第二个外显子上游和 HD-5 基因第一个外显子上游,在紧邻的内含子及下一个外显子上游中,也有同样的同源区,由此推测:两个基因 5' 端非翻译序列的不同可能是由缺失或插入引起的.

人的 β -防御素 hBD1、hBD2 基因位于染色体 8p22-23.1 上^[15],紧邻 α -防御素位点^[16],在鼠中也有同样现象^[11].牛、水牛及羊中, β -防御素基因则成簇地分布于染色体上^[11,17].

β -防御素基因的表达既有组成型的,又有诱导型的.在牛的牙槽巨噬细胞中,发现有高水平的 β -防御素 mRNA,且在不同的刺激条件下,mRNA 表达水平不变^[6],相反,牛上皮细胞中的 β -防御素在炎症介质及感染因子的诱导下,无论是在体内还是体外,均呈诱导型表达^[5].

根据 β -防御素的基因结构、分布及表达调控方

式,可将其分为两个亚族:a. TAP 类,它们均具有致密的基因结构,且氨基酸序列相似,含有一个 2 kb 的内含子,多表达于各种上皮细胞中,在炎症诱导介质如脂多糖或肿瘤坏死因子的作用下,呈诱导型表达. b. hBD-1 和 mBD-1 类,它们均含有一个 10 kb 的大内含子,主要在生殖泌尿系统中表达,对炎症诱导介质无明显反应.可见,同种动物中的同种防御素,在生物体内的不同部位其表达方式亦有所不同.

4 哺乳动物防御素的抑菌活性及其他功能特性

与其他抗微生物肽相比,防御素具有独特的抗性机理.首先,带正电荷的防御素分子与带负电荷的靶细胞膜相接触,随后通过靶细胞膜所产生的电动势将形成疏水面的防御素二聚体注入细胞膜,最后多个二聚体或高聚体在一起形成跨膜的离子通道,使膜通透化,从而扰乱细胞膜的通透性及细胞能量状态,导致细胞膜去极化,呼吸作用受到抑制以及细胞 ATP 含量严重下降,最终使靶细胞死亡.防御素的抗病毒作用则是通过与病毒外壳蛋白结合而导致病毒失去生物活性.

各种 α -防御素对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、分枝杆菌、真菌、被膜病毒、HIV 病毒在不同程度上都有抑制作用,其作用剂量在 1~100 mg/L 之间^[1].与其他抗微生物肽相比,防御素具有更广的抗性谱,尤其是 NP-1、NP-2,不但抗性谱广,抑菌活性也较强.但粒性细胞中防御素的活性往往会受到血清或阳离子如 Na^+ 、 Ca^{2+} 等不同程度的抑制. Na^+ 对其影响主要表现在抑制了带正电荷的防御素和带负电荷的微生物表面的非特异性静电互作; Ca^{2+} 的影响,特别是对革兰氏阴性菌,是在毫摩尔级影响防御素与细菌竞争寄主的特异结合位点.

根据 α -防御素的抑菌作用,可将其分为两类:a. 所带阳离子较多,可抗不具代谢活性的靶细胞.如 NP-1、NP-2; b. 阳离子较少,对代谢旺盛的目标则更具活性.如 NP-5、HNP-1, 2.

β -防御素也具有相对广泛的抗菌谱,从牛中分离的 β -防御素 TAP 能够抑制大肠杆菌 (*Escherichia coli*),铜绿假单胞杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*),肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsilla pneumoniae*),金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*),白假丝酵母 (*Candida albicans*),LAP 的

抑菌活性与 TAP 相似, 除了对肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 没有明显的抑制效果外, 对以上几种病原菌和热带白假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 有抑菌作用. 二者的最低作用浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 分别为 6~50 mg/L^[7]. 目前还未发现 β -防御素对病毒有作用的报道. 哺乳动物防御素除了具有微生物抗性外, 大量研究表明, 一些哺乳动物防御素还在免疫调节、激素调节、及刺激伤口愈合等方面有重要作用. 在体外, 兔防御素 NP-3a 及其他一些 α -防御素能够与兔肾上腺细胞的肾上腺皮质激素 (adrenocorticotrophic hormone, ACTH) 受体结合, 抑制由 ACTH 激发的类固醇的合成. 人嗜中性细胞防御素与磷脂、 Ca^{2+} 、腺苷三磷酸及底物共同作用, 成为纯化的蛋白激酶的潜在抑制因子. 一些哺乳动物防御素能够作为一种调理素增强槽巨噬细胞吞噬有机物的能力, 还能够促进成纤维细胞的有丝分裂及发炎位点的组织修复. Bateman 等^[18]发现从兔的肾脏中分离出一种由 32 个氨基酸组成的 α -防御素——RK-1 在兔肾的 Ca^{2+} 通道中起局部调节因子的作用.

5 哺乳动物防御素的应用前景

由于哺乳动物防御素具有广谱的抗微生物特性, 特别是 NP-1 和 NP-2, 不但对细菌、真菌和被膜病毒有广谱的毒杀效应, 对某些恶性肿瘤细胞、艾滋病病毒也有毒杀作用, 而且其作用机理特殊, 使微生物不易产生抗性, 因此在医药及植物抗病育种中有广阔的应用前景.

5.1 在植物抗病育种中的应用

随着植物基因工程技术的发展, 植物抗病育种虽然已经取得了相当大的进展, 但目前可利用的抗病基因并不多, 而且大多数抗病基因的微生物抗性谱不广, 因此将具有广谱性的防御素基因导入植物体中, 使植物能抗真菌和病毒, 则是培育抗病植物的最新策略之一.

Carmona 将大麦中的防御素 (thionin) 基因转到烟草中, 并获得了转基因植株, 对 *P. syringae* pv. *tabaci* 的抗性检测表明, 在侵染后三天, 只有少量坏死斑出现, 但也有研究表明, 即使 thionin 的表达量极高时, 转基因植株仍不能对病原菌产生任何抗性^[19]. 这种副结果可能是由于 thionin 没有分泌到细菌最常分布的细胞间隙的缘故. 本实验组已将兔 NP-1 基因转入烟草中, 抗性实验表明转基

因植株增强了对烟草青枯病的抗性并延缓了烟草青枯病的发病.

一般来说, 只转防御素单个基因, 只能产生局部抗性, 因此将防御素基因与几丁质酶或 β -葡聚糖酶基因共同转化, 则有可能得到满意的效果. 此外, 采用伤诱导启动子或组织特异性启动子来调控防御素的表达, 将有可能进一步提高防御素在植物体内杀伤病原物的能力, 并节省细胞能量.

5.2 在医药中的应用

由于防御素抗性谱广泛, 作用机理特殊, 微生物不易产生抗性, 因此在医药上也很具诱惑力. 但从宿主有机体中分离防御素成本极高, 使得防御素的利用受到限制, 因此通过基因工程手段大量生产防御素, 是使其得以广泛利用的有效途径. 科学家们一直试图研究出高效的细菌、酵母等表达载体系统. Reichhart (1992 年) 首次报道了昆虫防御素 A 在酵母中得到表达并纯化, Piers 等于 1993 年报道利用蛋白 A 作载体, 与人防御素 HNP-1 和昆虫杀菌肽 Cecropin/melittin (CME) 构建融合蛋白, 在细菌 *S. aureus* 中得到表达, 并分别测定了 HNP-1 和 CEME 的活性, 但遗憾的是, 只发现 CEME 有抗菌活性, 而 HNP-1 则不具活性^[20].

本研究组正通过单细胞真核藻类小球藻高效表达系统的建立, 将抗菌谱最为广泛的防御素 NP-1 基因转入小球藻, 探索生产防御素的转基因小球藻高效生物反应器系统, 为低成本生产昂贵的防御素, 使其今后在医药界得以广泛的应用, 为创造更大的经济效益和社会效益打下基础, 同时也为藻类生物反应器的广泛利用开辟道路. 目前我们已得到了稳定表达的转基因小球藻, 经检测表达产物具有抑菌活性, 该项研究已获得国家专利一项 (专利公开号 CN1203277A). NP-1 的大量提取和纯化工作正在进行. 通过临床实验有望为医药界提供一种新型的广谱、无抗性的抗生类药物.

参 考 文 献

- 1 Ganz T, Lehrer R I. Defensins. *Curr Opin Immunol*, 1994, (6): 584~589
- 2 Haynes R J, Tighe P J, Dua H S. Antimicrobial peptides of the human ocular surface. *Br J Ophthalmol*, 1999, 183 (6): 731~741
- 3 Mizukawan Sugiyama K, Ueno T, *et al.* Levels of human defensin 1, an antimicrobial peptide, in saliva of patients with oral inflammation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 1999, 87 (5) 539~543

- 4 Diamond G, Zasloff M, Eck H, *et al.* Tracheal antimicrobial peptide, a novel cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: Peptide isolation and cloning of cDNA. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1991, **88** (10): 3952~ 3956
- 5 Schonwetter B S, Stolzenberg E D, Zasloff M A, *et al.* Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science*, 1995, **267** (6): 1645~ 1648
- 6 Ryan L K, Rhodes J, Bhat M, *et al.* Expression of beta-defensin genes in bovine alveolar macrophages. *Infect Immun*, 1998, **66** (3): 878~ 881
- 7 Valore E V, Park C H, Quayle A J, *et al.* Human β -defensin 1: An antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest*, 1998, **101** (5): 1633~ 1642
- 8 Zhao C, Wang I, Lehrer R I, *et al.* Widespread expression of β -defensin hBP-1 in human secretory cells and epithelial cell. *FEBS Lett*, 1996, **396** (2): 319~ 322
- 9 Zhang G, Hiraiwa H, Yasue H, *et al.* Cloning and characterization of the gene for a new epithelial beta-defensin. Genomic structure, chromosomal localization and evidence for its constitutive expression. *J Biol Chem*, 1999, **274** (34): 24031~ 24037
- 10 Shi J, Zhang G, Wu H, *et al.* Procine epithelial beta-defensin 1 is expressed in the dorsal tongue at antimicrobial concentrations. *Infect Immun*, 1999, **67** (6): 3121~ 3127
- 11 Huttner K M, Kozak C A, Bevins C L, *et al.* The mouse genome encodes a single homology of the antimicrobial peptide human beta-defensin 1. *FEBS Lett*, 1997, **413** (1): 45~ 49
- 12 Bals R, Goldman M J, Wilson J M. Mouse β -defensin 1 is a salt-sensitive antimicrobial peptide present in epithelia of the lung and urogenital tract. *Infect Immun*, 1998, **66** (4): 1225~ 1232
- 13 Morison G M, Davidson D J, Kilanowski F M, *et al.* Mouse beta-defensin 1. *Mamm Genome*, 1998, (9): 453~ 457
- 14 Miyasaki K T, Lehrer R I. β -sheet antibiotic peptides as potential dental therapeutics. *Inter J Anti Agents*, 1998, (9): 269~ 280
- 15 Liu L, Zhao C, Heng H H, *et al.* The human β -defensin 1 and α -defensins are encoded by adjacent genes: Two peptide families with differing disulfide topology share a common ancestry. *Genomics*, 1997, **43** (2): 316~ 320
- 16 Bevins C L, Jones D E, Dutra A, *et al.* Human enteric defensin genes: Chromosomal map position and a model for possible evolutionary relationships. *Genomics*, 1996, **31** (1): 95~ 106
- 17 Gallagher D S, Jr Ryan A M, Diamond G, *et al.* Somatic cell mapping of beta-defensin genes to cattle syntenic group U25 and fluorescence *in situ* localization to chromosome 27. *Mamm Genome*, 1995, (6): 554~ 556
- 18 Bateman A, MacLeod R J, Lembessis P, *et al.* The isolation and characterization of a novel corticostatin/ defensin like peptide from the kidney. *J Biol Chem*, 1996, **271** (5): 10654~ 10659
- 19 Florack D E A, Dirkse W G, Visser B, *et al.* Expression of biologically active hordothionins in tobacco. Effects of pre- and pro-sequences at the amino and carboxyl termini of the hordothionin precursor on mature protein expression and sorting. *Plant Mol Biol*, 1994, **24** (1): 233~ 242
- 20 Piers K L, Brown M H, Hancock R E W. Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria. *Gene*, 1993, **134** (1): 7~ 13

Advances in the Research and Application of Mammal Defensin

CHEN Ying¹⁾, GE Yi-Qiang²⁾, LI Wen-Bin¹⁾, ZHANG Li-Ming¹⁾, SUN Yong-Ru^{1)*}

(¹⁾*Institute of Genetics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101;* (²⁾*College of Food Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China).*

Abstract Defensin is a kind of antimicrobial and cytotoxic peptides which have been found in a large range of living organisms. The mammal defensins have the most wide range antimicrobial spectrum. The distribution, structure, gene expression regulation of mammal defensins in China and abroad were summarized. Its application on medicine and plant resistant gene engineering were prospected.

Key words defensin, mammal, researching advance

* Corresponding author. Tel: 86-10-62892417, E-mail: yiqiangge@163.net

Received: November 23, 1999 Accepted: March 22, 2000