

防御素与炎症性肠病

吴小平, 欧阳春晖

■背景资料

防御素表达异常与消化系统、呼吸系统、皮肤科及耳鼻喉科等多种疾病的发病相关。动物实验表明, 肠道内的防御素在防止肠道免疫食物及饮水传播致病菌方面起到了关键的作用。

吴小平, 欧阳春晖, 中南大学湘雅二医院消化内科 湖南省长沙市 410011

通讯作者: 吴小平, 410011, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅二医院消化内科. wxp2006@126.com

收稿日期: 2008-08-14 修回日期: 2008-08-30

接受日期: 2008-09-08 在线出版日期: 2008-10-08

Defensin and inflammatory bowel disease

Xiao-Ping Wu, Chun-Hui Ouyang

Xiao-Ping Wu, Chun-Hui Ouyang, Department of Gastroenterology, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China

Correspondence to: Xiao-Ping Wu, Department of Gastroenterology, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China. wxp2006@126.com

Received: 2008-08-14 Revised: 2008-08-30

Accepted: 2008-09-08 Published online: 2008-10-08

Abstract

It is commonly considered that genetic and environmental factors (e.g. infection) contribute to the occurrence of inflammatory bowel disease (IBD). In recent years, defensin family was attracting great attention because of its role in the innate defense system. In this paper, we review the defensin's types, distribution, gene expression regulation, antimicrobial effects and relationships with IBD as well as its future application prospects.

Key Words: Defensin; Inflammatory bowel disease; Innate immune; Differential; diagnosis Crohn's disease; Ulcerative colitis

Wu XP, Ouyang CH. Defensin and inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(28): 3204-3207

摘要

目前普遍认为炎症性肠病是在遗传背景的前提下, 环境因素(如感染等)导致肠道免疫紊乱而发病。近年来, 防御素(defensin)家族在先天性防御体系中的作用日益受到研究学者的重视。本文就防御素的种类、分布、基因表达调

控、其抗微生物作用, 以及其与炎症性肠病的关系和应用前景作一综述。

关键词: 防御素; 炎症性肠病; 先天免疫; 鉴别诊断; 克罗恩病; 溃疡性结肠炎

吴小平, 欧阳春晖. 防御素与炎症性肠病. 世界华人消化杂志 2008; 16(28): 3204-3207

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3204.asp>

0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种肠道非特异性慢性复发性炎症, 主要包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)。IBD的病因和发病机制至今尚未完全阐明。目前普遍认为本病是在遗传背景的前提下, 环境因素(如感染等)导致肠道免疫紊乱而发病。近年来, 防御素(Defensin)家族在先天性防御体系中的作用日益受到研究学者的重视。防御素表达异常与消化系统、呼吸系统、皮肤科及耳鼻喉科等多种疾病的发病相关。动物实验表明, 肠道内的防御素在防止肠道免疫食物及饮水传播致病菌方面起到了关键的作用。多篇文献报道炎症性肠病患者体内防御素水平发生了明显的变化, 从而推测防御素表达或功能缺陷可能是导致发生IBD的重要原因之一。本文综述防御素的种类、分布、基因表达调控及其抗微生物作用, 探讨其与炎症性肠病的关系及应用前景。

1 人类防御素的分类及生物学功能

1980年, Lehrer *et al*首次从兔肺巨噬细胞分离并纯化出两个阳离子性极强的小分子物质, 后又从人中性粒细胞胞质颗粒中发现了一系列一级结构相似的小分子物质, 由于他们均具有广谱抗微生物活性而被命名为防御素^[1]。防御素是哺乳动物内在最大的防御系统, 可分为 α -防御素、 β -防御素和 θ -防御素。人体主要以前两种为主, 目前已经识别和分离出6种 α -防御素和6种 β -防御素。 α 防御素由29-36个氨基酸组成, 其中 α -防御

■同行评议者

张筱茵, 副教授, 中国人民解放军第四军医大学西京医院消化疾病研究所

素1-4主要位于中性粒细胞中, 又被称为中性粒细胞多肽(HNP), 而 α -防御素5、6(HD-5、HD-6)则由小肠潘氏细胞分泌. 人类肠道中潘氏细胞 α -防御素在肠内表达量在各个肠段有所不同, 其中十二指肠的表达量最少, 空肠、回肠内表达相对较多. β -防御素(HBD)由36-42个氨基酸组成, 广泛表达于黏膜、上皮组织中. HBD-1主要在肾脏、泌尿生殖道和其他上皮细胞内表达, 在正常人扁桃体内也可检测到, HBD-2主要表达于损伤的皮肤、口腔黏膜以及被感染的肺部上皮, HBD-3主要在人的角化细胞和气道上皮细胞内表达, HBD-4主要表达于睾丸、子宫、中性粒细胞、甲状腺、肺及肾也有低水平表达, HBD-5和HBD-6仅仅在附睾细胞中表达^[2-3]. α -防御素主要参与全身系统和小肠宿主防御, 而 β -防御素还可刺激未成熟的树突细胞和T细胞参与后天获得性免疫反应^[4]. 防御素具有广谱抗微生物活性, 对革兰阳性和阴性菌、厌氧菌、真菌以及一些有包膜病毒等都有强大的杀灭作用, 特别是在低盐离子、低血浆蛋白条件下, 防御素的杀菌浓度可达到1-10 mg/L^[5]. 对于防御素生物活性机制, 大部分认为主要和微生物的细胞膜结构有关: 防御素带正电荷, 可通过静电作用与带负电荷的细菌胞膜脂质双层结合, 对G⁺菌, 防御素在细菌胞膜的电势驱动下, 以单聚体或多肽体聚集, 并通过分子移动在胞膜上形成多个通道, 使细胞内容物渗出, 导致细胞死亡. 而对G⁻菌, 防御素则无法先穿过细菌外膜, 而是通过与胞壁脂多糖(LPS)结合, 竞争性取代在LPS分子间起桥梁作用的二价阳离子(Ca²⁺、Mg²⁺)穿过外膜, 然后再在内膜上形成通道, 最终造成细菌胞膜的完整性被破坏, ATP、K⁺丢失, 呼吸受阻, 最终导致细菌死亡. β -防御素可以诱导T细胞(CD8⁺ T细胞)与幼稚CD4⁺ T细胞的迁移, 其次是通过与树突状细胞的CCR6受体结合募集非成熟性的树突状细胞(imature dendritic cell, IDC). 防御素还能通过诱导细胞因子的释放和介导IDC协同刺激分子的表达上调, 促进IDC的成熟, 进而活化T细胞, 触发特异性免疫应答^[6-7]. β -防御素也可以诱导肥大细胞脱颗粒和一些炎症前期细胞因子的产生, 促进中性粒细胞在炎症部位的聚集, 扩大病变的局部炎症反应.

2 防御素与CD

CD是一种严重的肠道慢性炎症, 病变部位可发生于整个消化道的任何部位, 病变形式多变. CD的发病是遗传因素与环境因素共同作用的

结果. 随着基因组研究的发展, 一些基因包括NOD2(CARD15)(MIM 605956), 1DLG5(MIM 04090)以及OCTN(MIM 604190、603377)都被认为与CD的发生相关^[8]. 肠道防御素是机体抵御外源性致病因子的重要屏障, 而在CD患者中, 肠道的防御素表达水平存在着差异. 回肠段病变的CD患者, 回肠潘氏细胞防御素HD-5和HD-6的表达均较正常人和非回肠段病变的CD患者明显降低, 而且这种防御素水平变化与NOD2基因突变密切相关. 结肠组织活检发现无NOD2基因突变的CD患者结肠组织中HD-5和HD-6的表达量反而增高^[9]. 而HD-5、6的水平降低影响了肠道黏膜的天然屏障作用, 导致黏膜细菌附着引起进一步损害. Wehkamp *et al*^[10]报道在回肠CD患者中, 作用于潘氏细胞分化和防御素表达的调节因子Tcf-4 mRNA的表达量明显下降, 这导致了潘氏细胞分泌防御素水平和灭菌活性的双重降低, 而Tcf-4的WNT传导通路和潘氏细胞防御素的关联变化与NOD2的基因型无关, 提示这可能是一个重要的导致回肠CD发病的机制之一. 与小肠性CD不同的是, 结肠CD主要表现为HBD-2(MIM 602215)、HBD-3(MIM 606611)和HBD-4的表达异常^[11]. 目前已经证明, HBD的基因簇位于染色体8p23.1上, 其DNA拷贝数在正常人群中有很大的差异性. 应用RT-PCR和即时PCR方法均可以检测到在CD病变的结肠上, HBD-2表达明显下调, CD炎症黏膜HBD-2的表达与非特异性结肠炎比较明显降低. CD非炎症黏膜区和无炎症的对照组比较, HBD-2的水平没有差异^[12]. 目前一些研究表明, 应用SASP或者5-ASA治疗CD同时使用外源性抗生素(如甲硝唑、奎诺酮类抗生素), 其效果与同时应用糖皮质激素效果接近, 并能有效缓解肛门窦道引起的疼痛, 促进窦道愈合, 这从另一方面佐证了CD的发病与防御素的缺陷有关^[13].

3 防御素与UC

过去认为UC在欧美国家多见, 但近年来中国文献报道的病例数显著增多^[14]. 溃疡性结肠炎病变主要累及结肠. 正常人结肠黏膜很少表达HD-5和HD-6, 而UC患者结肠上皮细胞中HD-5和HD-6 mRNA的表达水平显著高于正常人, 且HD-6的表达具有特异性, 即在非感染性的结肠炎中表达并不明显^[9,13-14]. 人HBD-1在肠道上皮细胞有持续的表达, 不受外界因子的影响, 起基础防御的功能. 有研究发现UC和CD结肠黏膜

■ 相关报道

多篇文献报道炎症性肠病患者体内防御素水平发生了明显的变化, 从而推测防御素表达或功能缺陷可能是导致发生IBD的重要原因之一.

■应用要点

目前生产防御素的研究尚处初始阶段,随着基因工程的进步,有望生产出大量防御素并将为IBD的治疗带来新的飞跃。

HBD-1的基因表达量有所降低,这种降低可能导致黏膜抗菌活性的降低,从而导致细菌入侵机体继发炎症应答。在感染的结肠特别是UC中HBD-2可被诱导性表达,且这种诱导性表达在UC患者进行全结肠手术后的回肠型肛门囊袋黏膜中仍有相似改变^[15]。HBD-2只在感染的情况下被诱导表达,在非感染的情况下,不论是UC还是CD,患者肠道HBD-2表达均很低。这说明UC发生可能由于HBD-2被过度表达从而加重肠道炎症反应有关。HBD-3的表达量和HBD-2存在一定的相关性,在UC时亦有明显增加^[16]。HBD-4 mRNA水平在UC的肠上皮细胞中明显增高。UC患者的HD表达量与UC病变范围的范围、程度成正相关而CD中未发现有明显的变化^[17]。

4 防御素与其他胃肠道炎症

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染与萎缩性胃炎、消化性溃疡、胃癌及胃黏膜相关性淋巴组织淋巴瘤的发生密切相关。胃黏膜感染*H. pylori*后,中性粒细胞的趋化及趋化因子的出现均提示有先天性免疫机制的参与^[18]。人 β 2防御素2(HBD-2)由上皮细胞产生,在胃黏膜表面发挥防御作用,对革兰染色阴性细菌具有高效的杀菌作用^[19]。Hamanaka *et al*^[20]采用RT-PCR、免疫组化、原位杂交等方法对6例*H. pylori*阳性和6例*H. pylori*阴性胃炎患者的胃黏膜组织研究结果表明,*H. pylori*感染者胃黏膜上皮和胃小凹处HBD-2 mRNA表达显著上调,而*H. pylori*阴性者未见明显HBD-2 mRNA条带。*H. pylori*根除后,HBD-2 mRNA的转录水平和蛋白的免疫活性均显著降低。提示HBD-2可能参与*H. pylori*介导胃黏膜的炎症反应。

5 防御素的药物研发

传统抗生素对机体均有程度不同的毒副作用,且致病菌几乎可对现有的所有抗生素产生耐药性。与之相比,防御素具有广谱抗微生物活性,而微生物不易产生抗体,因而无耐药性。防御素对同种属细胞无毒性作用,因而无抗生素的毒副作用。因防御素的广谱抗菌和低毒性,从理论上说有望成为最理想的新型杀菌药物。但从有机体中分离防御素成本极高,使防御素的研究和应用受到限制,因此通过基因工程手段大量生产防御素是一有效途径。1999年,Linzmeier *et al*^[21]应用P1(探针)和BAC(细菌人工染色体)克隆的方法,确定了人 α -防御素与 β -防御

素基因位于8p23,其顺序为HDEFA5(HD25)、HDEFA1/1A(HNP21/3)、DEFA4(HNP24)、HDEFA6(HD26)、HDEFB1(HBD21)。Piers *et al*^[22]最早将人防御素克隆表达,他将HNP21和CEME(人工合成的杂合抗菌肽)分别与GST(Glutathione2s2transferase)、oprF(*paeruginosa* outermembrane protein F)、SPA(*staphylococcal* protein A)、IgG结合序列连接,在大肠杆菌和金黄色葡萄球菌中融合表达,但遗憾的是,只发现CEME有抗菌活性,而HNP21则不具活性。2004年,Wang *et al*采用了细菌偏爱的密码子,将hBD2基因串连起来,并以多拷贝形式在大肠杆菌中表达,使其表达量提高了9倍^[23]。Harder *et al*^[24]把hBD3与His2Tag连接,导入大肠杆菌中表达,经肠激酶消化,HPLC纯化,得到了具有天然活性的防御素,但产量不详。陈姍 *et al*^[25]和李春丽 *et al*在大肠杆菌中成功克隆表达了有活性的hBD3。对于防御素基因的克隆和表达研究已取得一定进展,随着研究的深入,采用基因工程方法生产的防御素必将在研究和医药中发挥重要作用^[26]。

6 结论

就IBD领域而言,防御素的研究前景可归纳如下三方面:(1)对防御素的深入研究有助于IBD发病机制的阐明。防御素作为天然免疫系统的重要组成部分,其表达下调或功能缺陷在IBD的发病中起着重要作用。但IBD时防御素变化的始动因素及表达调控机制是什么?防御素怎样影响免疫应答从而怎样保护性地影响疾病的进程?这些问题远未明了,有待深入研究。(2)如前所述,不同防御素亚型尤其是HBD在UC和CD中的表达量有明显差异,因此防御素亚型的研究可望为UC与CD二者间的鉴别诊断提供帮助。(3)防御素对IBD的治疗前景。防御素的抗微生物作用及IBD时防御素表达变化已如前述。肠道细菌的存在是IBD发病的前提条件。肠道黏膜的免疫应答可抵抗细菌对黏膜的损害而不致发病,而防御素是维持免疫应答的重要因子。因此提高防御素水平对防治IBD具有重要意义。此外,在IBD的发展过程中,患者往往合并细菌感染,通常临床上需加用抗生素治疗,而用外源性防御素代替抗生素的优势已如前述。但目前生产防御素的研究尚处初始阶段,随着基因工程的进步,有望生产出大量防御素并将为IBD的治疗带来新的飞跃。

7 参考文献

- 1 Lehrer RI, Ferrari LG, Patterson-Delafield J, Sorrell T. Fungicidal activity of rabbit alveolar and peritoneal macrophages against *Candida albicans*. *Infect Immun* 1980; 28: 1001-1008
- 2 Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 2001; 276: 5707-5713
- 3 García JR, Krause A, Schulz S, Rodríguez-Jiménez FJ, Klüver E, Adermann K, Forssmann U, Frimpong-Boateng A, Bals R, Forssmann WG. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J* 2001; 15: 1819-1821
- 4 O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann L, Ganz T, Kagnoff MF. Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol* 1999; 163: 6718-6724
- 5 Ganz T. Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1987; 55: 568-571
- 6 Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 9-14
- 7 Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 1999; 286: 525-528
- 8 Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schäffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, Schröder JM, Bevins CL, Fellermann K, Stange EF. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 2004; 53: 1658-1664
- 9 Fahlgren A, Hammarstrom S, Danielsson A, Hammarstrom ML. beta-Defensin-3 and -4 in intestinal epithelial cells display increased mRNA expression in ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2004; 137: 379-385
- 10 Wehkamp J, Wang G, Kübler I, Nuding S, Gregorieff A, Schnabel A, Kays RJ, Fellermann K, Burk O, Schwab M, Clevers H, Bevins CL, Stange EF. The Paneth cell alpha-defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4. *J Immunol* 2007; 179: 3109-3118
- 11 Fellermann K, Wehkamp J, Herrlinger KR, Stange EF. Crohn's disease: a defensin deficiency syndrome? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 627-634
- 12 Kiehne K, Brunke G, Wegner F, Banasiewicz T, Folsch UR, Herzig KH. Defensin expression in chronic pouchitis in patients with ulcerative colitis or familial adenomatous polyposis coli. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1056-1062
- 13 Wehkamp J, Schwind B, Herrlinger KR, Baxmann S, Schmidt K, Duchrow M, Wohlschläger C, Feller AC, Stange EF, Fellermann K. Innate immunity and colonic inflammation: enhanced expression of epithelial alpha-defensins. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 1349-1355
- 14 Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Mueller O, Herrlinger KR, Fellermann K, Schroeder JM, Stange EF. Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 9: 215-223
- 15 Malaviya R, Ikeda T, Ross E, Abraham SN. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* 1996; 381: 77-80
- 16 常玉英, 欧阳钦. 克罗恩病与防御素缺陷. 临床消化病杂志 2005; 17: 261-263
- 17 Wehkamp J, Schmid M, Fellermann K, Stange EF. Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn's disease. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 460-465
- 18 Schmid M, Fellermann K, Wehkamp J, Herrlinger K, Stange EF. [The role of defensins in the pathogenesis of chronic-inflammatory bowel disease] *Z Gastroenterol* 2004; 42: 333-338
- 19 Wehkamp J, Schmidt K, Herrlinger KR, Baxmann S, Behling S, Wohlschläger C, Feller AC, Stange EF, Fellermann K. Defensin pattern in chronic gastritis: HBD-2 is differentially expressed with respect to *Helicobacter pylori* status. *J Clin Pathol* 2003; 56: 352-357
- 20 Hamanaka Y, Nakashima M, Wada A, Ito M, Kurazono H, Hojo H, Nakahara Y, Kohno S, Hirayama T, Sekine I. Expression of human beta-defensin 2 (hBD-2) in *Helicobacter pylori* induced gastritis: antibacterial effect of hBD-2 against *Helicobacter pylori*. *Gut* 2001; 49: 481-487
- 21 Linzmeier R, Ho CH, Hoang BV, Ganz T. A 450-kb contig of defensin genes on human chromosome 8p23. *Gene* 1999; 233: 205-211
- 22 Piers KL, Brown MH, Hancock RE. Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria. *Gene* 1993; 134: 7-13
- 23 Wang F, Fang X, Xu Z, Peng L, Cen P. Fusion expression of human beta-defensin-2 from multiple joined genes in *Escherichia coli*. *Prep Biochem Biotechnol* 2004; 34: 215-225
- 24 Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 2001; 276: 5707-5713
- 25 陈娜, 何凤田, 董燕麟, 李蓉芬, 高会广, 陈敏, 彭家和. 人β防御素3融合蛋白在大肠杆菌中的表达、纯化与活性分析. 中国生物化学与分子生物学报 2004; 20: 490-495
- 26 蔡绍晖, 杜军, 黄宁, 王伯瑶. 重组人β-防御素-2基因在昆虫细胞的转染表达. 四川大学学报(医学版) 2004; 35: 832-835

■同行评价

本文对防御素在未来炎症性肠病的治疗中的可能作用进行了展望, 论述条理清晰, 引用文献新, 所得结论有文献的有力支持, 是一篇有较强学术价值和可读性的综述。

编辑 李军亮 电编 何基才