

抗菌肽在宿主防御中的作用

史春林^{1,2} 王云峰^{1,2*} 石星明² 王 玫² 孙 妍² 童光志^{3*}

(1 东北农业大学生研究生学院 哈尔滨 150030)

(2 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室禽传染病研究室 哈尔滨 150001)

(3 中国农业科学院上海兽医研究所 上海 200232)

摘要 抗菌肽广泛地存在于自然界中,其中许多抗菌肽具有直接抗微生物活性,能作用于 G^- , G^+ 细菌、真菌、寄生虫甚至是包膜病毒,并且在宿主先天免疫和适应性反应中有重要的调节作用。近来,越来越多的证据表明抗菌肽是有效的免疫辅助因子,能够与其他的众多免疫效应子协同作用,从而起始适应性免疫,促进伤口愈合,抑制前炎症反应以及诱导和调节细胞因子和趋化因子的产生。另外,随着抗菌肽作用机理逐渐被揭开,将这些内源性肽及其衍生物制成抗感染治疗药剂将会有广阔的应用前景。

关键词 先天免疫 宿主防御 抗菌肽

中图分类号 Q819

随着病原菌耐药性的增强以及新型病菌的不断出现,我们迫切需要寻找有效的替代方法来治疗传染病。在治疗学的发展中,免疫调节分子成为很有吸引力的候选对象,因为免疫调节分子并不直接作用病原体,而是通过选择性加强和/或转变宿主防御机制来清除病原体。抗菌肽(AMPs)就是与宿主免疫防御相关的一个重要的进化保守型生物大分子,它能够加强先天免疫反应,选择性调节病原体诱导的炎症反应。本文将综合近年来抗菌肽的研究成果,从以下几个方面进行阐述:(1)近年来关于作为先天免疫调节子的抗菌肽的作用机制及研究进展情况;(2)抗菌肽在先天性免疫和适应性免疫中的重要作用;(3)抗菌肽在治疗感染性疾病方面的应用价值。

1 抗菌肽的发现

1972年,瑞典科学家 Boman 等首先在果蝇中发现了抗菌肽,随后 Steiner 等^[1]以惜古比天蚕 *Hyalophora cecropia* 为实验材料,注射蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus*

诱导产生抗菌肽(cecropins)。该肽在昆虫天然免疫中发挥着重要的作用。这也被认为是第一个真正意义上的抗菌肽。他们的发现引起了人们对于昆虫天然免疫研究的浓厚兴趣,导致了多种不同种属来源的抗菌肽的发现,并将这一研究扩展到了昆虫以外的生物。在海洋生物中也发现了相关的肽类物质,其中在豹蟾体上分离到一种 33 个氨基酸残基的抗菌肽并命名为 pardaxin,研究发现它具有比蜂毒素更强的抗菌活性和更低的人红血球溶血活性^[2]。两栖动物由于其生活环境及自身皮肤的特点,以及在长期自然选择的结果影响下,它们的皮肤能够分泌大量的抗菌肽类物质,其含量之高是其他动物无可比拟的。如 Magainins 是爪蟾产生的含 21 ~ 27 个氨基酸的一类碱性无半胱氨酸的抗菌肽^[3]。微克分子浓度的 Magainins 能杀死 G^+ , G^- 细菌、真菌和原生动物的,甚至真核的肿瘤细胞,但它们不伤害体细胞或红细胞。硫素(thionin)是最早从植物中分离的抗菌肽,对多种微生物细胞及哺乳动物细胞均有毒性。在哺乳动物的吞噬细胞和黏膜上皮细胞中同样也发现了以防御素和 Cathelicidins 家族为代表的抗菌肽,这些抗菌肽除了有抗菌活性外,还具有多种免

疫调控功能。

到目前为止,已从自然界中发现 900 多种抗菌肽,它们作为生物机体的防御效应因子而广泛存在,包括无脊椎动物,脊椎动物甚至在一些细菌本身。

2 抗菌肽的一般性质

抗菌肽是生物体产生的一种具有抗菌活性的多肽,它们在一级结构和长度上各不相同,但是它们通常是两亲性的,分子表面有疏水性区域和亲水性区域,分子量小,12~50 个氨基酸残基,因富含精氨酸或赖氨酸,至少带有 2 个正电荷。根据结构的不同,抗菌肽大体可以归为 4 大类:(1)两亲的 α 螺旋结构;(2)通过 2 个或 3 个二硫键稳定的 β 片层结构;(3)延展结构;(4)含有 1 个二硫键的环形结构。

抗菌肽是由基因编码和 mRNA 模版翻译的。哺乳动物中,多种类型的细胞,诸如巨噬细胞、嗜中性粒细胞、上皮细胞、角化细胞和肥大细胞等,都能够表达抗菌肽。通常抗菌肽以失活前体的形式表达,通过特异性酶的水解作用释放出成熟的、有生物学活性的抗菌肽。由于抗菌肽具有种间特异性,不同抗菌肽其表达方式也各不相同。一些抗菌肽是组成型表达多肽,而其他的则是受到微生物信号分子、炎症或组织损伤的强烈刺激而诱导表达的多肽。例如,在小肠上皮细胞中,人 β 防御素-1 (hBD-1) 是一种组成型表达抗菌肽,而相反的是,hBD-2 是因肠内病原菌感染而被快速诱导表达的抗菌肽,并且 hBD-3 的表达与炎症紊乱性疾病,如 hBD-3 的表达与克罗恩病明显相关^[4]。一般来说,生物机体在刚刚遭受感染时,就会受到来自内源性和外源性等多种炎症介质的刺激而使得抗菌肽的表达量大大增加。可是,为什么不同生物个体响应不同刺激时表达抗菌肽会采用不同的表达模式和途径仍然没有完全被揭开。

3 抗菌肽的生物学活性

3.1 直接抗菌活性

最初,对抗菌肽的关注是因为它们具有直接抗菌活性。在抑菌浓度下,抗菌肽能够与生物膜/壁组成成分或胞内细胞器等多种微生物靶位相互作用,前者破坏细胞质膜的完整性,后者干扰细胞的正常代谢活动,最终导致细菌死亡。这种特性是与抗菌肽的疏水性、净带正电荷量、构象的柔韧度以及二级结构有关。事实上,许多天然抗菌肽的直接抗菌活性并没有达到最

优化,可以通过适当氨基酸的简单置换得到改善^[5]。另外,抗菌肽的不同结构层次对它们在宿主免疫中所表现出功能的影响,至今还没有得到充分研究,因此值得进一步探究。

虽然,一些抗菌肽有着十分有效的直接杀菌特性,被认为是天然抗生素,但是并非所有的阳离子肽都是通过直接杀菌活性而对宿主起保护作用的。因为在生理相关条件下,多数哺乳动物抗菌肽的直接抗菌活性是受到抑制的。例如,在黏膜表面,生理盐浓度(100mmol/L 的一价阳离子和 2mmol/L 二价阳离子)下,抗菌肽的抗菌活性受到很强的拮抗作用^[6]。可是,在这种条件下,抗菌肽却能与宿主免疫系统相互作用,表现出很多免疫调控功能。

3.2 抗菌肽的免疫功能

抗菌肽是预防感染的免疫遗传分子,因为它们缺失会导致传染病易感性的增加,而抗菌肽的过量表达或外源注射都对动物有很好的抗感染保护作用。在生理相关条件下,抗菌肽能够表现出广泛的免疫功能(图 1),包括在先天性免疫细胞中与炎症反应、先天性免疫和适应性免疫相关的活性,在单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、T 细胞和树突状细胞中作为先天性免疫和适应性免疫沟通的桥梁^[6-9]。

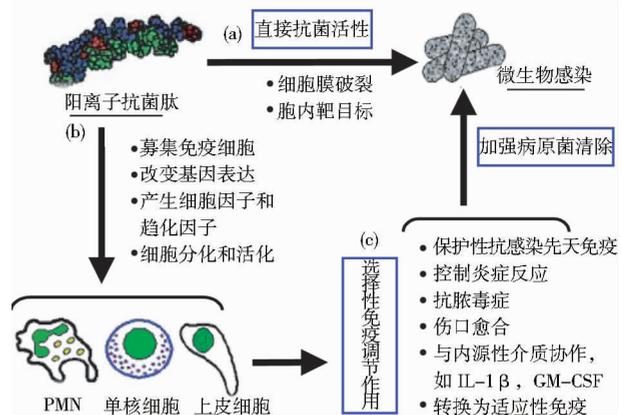


图 1 抗菌肽的抗感染特性

Fig. 1 Anti-infective properties of cationic host defence peptides

3.2.1 抗内毒素作用 当宿主刚刚遭受感染的同时,宿主机体就启动炎症应答来对抗疾病。可是,当有过度的病原性刺激或某一炎症应答的调节环节出现中断,都会导致炎症反应失控,从而引发系统性炎症综合症或脓毒症。可是,多种来源的抗菌肽,包括昆虫的天蚕抗菌肽和蜂毒肽的杂合肽(CEMA)^[10],人 LL-37^[11],

牛 BMAP-27^[12] 和 indolicidin^[7] 以及人工合成的阳离子肽^[7], 都具有平衡和调节炎症应答的作用, 它们抑制内毒素诱导的前炎症基因表达, 阻止分泌型蛋白炎症介质, 如抑制肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和内毒素诱导的核转位的核因子- κ B (NF- κ B) 亚单位的分泌, 却产生和释放出多种趋化因子来维持其他前炎症应答, 以达到选择性抑制前炎症应答作用, 预防内毒素血症。如果从抗菌肽抗内毒素作用的整体性来看, 可以推断出它们不仅抑制由病原性刺激引起的炎症, 而且还可以通过抑制由共生菌群起始的炎症应答(在宿主共生菌群中含有同样的特征分子, 如 LPS, LTA, CpG, DNA 等, 这些特征分子能通过 TLR 途径引发炎症)来维持内环境稳定。更为重要的是, 因为抗菌肽并不单独作用一个炎症调节子, 而是作用多种调节子并有选择性地增强或/和抑制某一或/和某些应答, 使得它们成为很有吸引力的抗内毒素因子。

关于抗菌肽抗内毒素作用的机制可能有两个: 一个是抗菌肽直接与 LPS 结合, 后来发现这似乎与抗内毒素活性仅有部分联系; 另一个是抗菌肽参与从内毒素诱导的 TLR 到 NF- κ B 途径的信号系统调节作用。随着与这两种作用机制相关的资料的不断增多, 抗菌肽抗内毒素作用的复杂机制必将会被慢慢地揭开^[10,11]。

3.2.2 趋化活性 当病原菌侵入时, 感染部位的组织细胞会分泌趋化因子, 如白细胞介素-8 (IL-8) 和单核细胞趋化蛋白-1/3 (MCP-1/3), 它们激活包括嗜中性粒细胞在内的其他免疫效应细胞, 导致抗菌肽, 如 α 防御素和 LL-37 的产生, 并伴随着其他的一些免疫反应^[8]。分泌的防御肽能够直接或间接地依次促进效应细胞, 如嗜中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、未成熟的树突状细胞和 T 细胞, 更多地聚集到感染部位发挥抗感染作用。如在低生理学浓度下, 抗菌肽能够诱发免疫效应细胞的趋化性及趋化因子的产生, 或在稍微高的生理学浓度下, 防御肽自己本身作为趋化因子, 募集粒性白细胞到感染部位发挥先天和适应性免疫反应作用^[6,9,13,14]。因此, 抗菌肽的一个重要特性就是能够选择性诱导和产生多种趋化因子/细胞因子, 如 CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1 和干扰素- α (IFN- α) 作为免疫效应子。

3.2.3 在适应性免疫中的作用 众所周知, 先天免疫中的介质因子对淋巴细胞适应性免疫的触发起到了指导性作用。当生物机体受到病原菌攻击时, 先天免疫细胞组分会快速聚集到感染部位, 诱导一系列免疫介

质的产生, 如细胞因子、趋化因子和抗菌肽等。而这些先天免疫介质能够直接活化包括具有抗原呈递作用的未成熟的树突状细胞在内的先天免疫细胞, 随后激活特异性免疫增强细胞因子以及 T 和 B 淋巴细胞亚单位, 进而导致抗原特异性的适应性免疫反应的起始和发展。例如, 人 α 防御素 HNP-1 和 HNP-2、鼠 β 防御素、猪 PR-39 和人 LL-37, 都可作为未成熟树突状细胞和 T 细胞的化学引诱物^[8,13,15], 而且它们还可以以佐剂的形式与未成熟树突状细胞和 T 细胞上多种受体相互作用, 进而影响抗原特异性的适应性免疫的强弱^[16]。研究证实, 人防御素能够促进细胞增殖, 增强 IFN- γ 、IL-10 和 IL-6 诱导 CD4⁺ T 细胞的细胞因子反应, 调节联合刺激分子的表达^[17]。而且人防御素与抗原一起注入小鼠体内, 导致抗原特异性血清抗体明显增加, 说明人防御素参与体液免疫反应, 并且有可能具有佐剂特性。同样地, 人 α 防御素和鼠 β 防御素能够促进抗原特异性细胞毒 T 淋巴细胞的诱导作用, 藉此增强辅助性 T 细胞-1 (TH1) 依赖的细胞反应, 并形成潜在的抗肿瘤免疫^[17]。总之, 抗菌肽作为免疫系统的一个基本组成元件, 在先天和后天免疫反应之间发挥着重要的枢纽作用^[9], 并以信号的形式影响着适应性免疫反应的起始、发展和扩大。而且, 随着对抗菌肽作为先天防御调节子的生物学原理的理解不断加深, 对抗菌肽进行结构改造以增加其功能活性并使其进一步发展为新型治疗剂和佐剂成为了可能。

3.2.4 其它先天免疫功能 抗菌肽对调节下游先天免疫基因功能的关键信号途径也有影响作用, 这些信号途径或者被活化, 或者/并被调节到不同信号强度。如在肥大细胞、角质化细胞和单核细胞中, 人 LL-37 和 β 防御素, 能够激活细胞分裂素活化蛋白激酶 (MAPK) p38 和胞外信号调节激酶-1/2 (ERK1/2)^[18,19]。同样, 在炎性环境下, 抗菌肽能够与粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 或 IL-1 β 等免疫效应分子相互协作^[11,18], 形成了一个由免疫调节子和下游信号途径组成的复杂网状系统, 最终形成一个有效的整体性防御屏障。除了上述提到的功能外, 抗菌肽还具有其他免疫调节功能, 如通过抑制程序性细胞死亡来延长嗜中性粒细胞的生活周期, 对细胞分化和增殖、肥大细胞的活化和脱粒、伤口愈合、血管发生以及树突状细胞吸收和提呈抗原都有促进作用^[13,19]。

4 抗菌肽的应用前景

由于传统抗生素的大量使用, 尤其是抗生素的滥

用问题没有得到有效控制,导致多重抗药菌的产生。那些不直接作用病原微生物而是通过选择性调节宿主免疫系统来清除病原微生物的抗菌肽,降低了病原微生物产生耐药性的可能性,使得这些多肽非常有希望应用到传染病的治疗上。总之,鉴于抗菌肽的选择性免疫调节生物活性,可以看得出对抗菌肽具有广泛的开发应用前景:(1) 抗菌肽并不是直接作用于病原微生物,而是通过其选择性免疫调节活性来清除病原微生物,基于此可以将其制成抗感染制剂,使其有效地针对包括多重耐药菌株和新出现菌株在内的病原微生物引起的感染;(2) 因为抗菌肽除了具有选择性调节和/或保持一定宿主免疫反应的作用外,还有着强大的抗炎特性,基于此可以将其制成治疗急性诱发或慢性炎症紊乱的生物制剂;(3) 因为这些免疫调节肽能够影响适应性免疫反应的起始和发展^[9,13],或许可以将它们制成佐剂。除了上述提到的应用范畴外,抗菌肽还可以被用作单一的治疗制剂,或者与传统抗生素联合应用发挥协同效应。

自然界里有大量进化保守的抗菌肽,以这些丰富的抗菌肽资源作模版,可以人工设计和合成上述提到的功能类型的小肽,制成生物制剂应用到传染病预防和治疗上,会有良好的发展前景。目前,人工设计合成抗菌肽的方法主要有三个:(1) 结构上作适当的改变以保持或加强与内源性抗菌肽一致的二级结构和物理性质;(2) 随机突变编码阳离子肽的合成基因;(3) 以系统性和随机性置换氨基酸残基为基础,在纤维素膜上机械合成肽库^[20]。然而,目前上述这些方法仅仅被用来优化抗菌肽的抗微生物活性。

目前临床应用的抗菌肽主要倾向于含有生物活性核心区域的内源性分子,因缺少了相关的毒性成分而降低了毒力却提高了短肽的活力,缩减了成本。最近,一些生物技术公司开始着眼于抗菌肽向治疗制剂上发展。迄今为止,有4种抗菌肽完成了三期临床效力试验^[21,22]。其中,Neuprex是一种重组形式的BPI₂₁,是人类抗生素渗透蛋白的一个修饰片段,它不仅能够预防和治疗小儿脑膜炎球菌血症,而且能够结合、中和、清除一些特殊细菌释放的破坏性内毒素(其中有一部分可以引起严重的败血症)。Pexiganan是一种合成的magainin类抗菌肽类,该多肽药物对多种复杂的皮肤深部感染有效,例如脓疱病、糖尿病足、手术伤口感染和褥疮。该药物的优势在于对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌引起的局部感染都有效,包括其他抗生素耐药菌

引起的感染。另外,还有以猪 protegrin 衍生物 IB-367 为基础合成的 Isegranin 和来源于牛 indolicidin 变体 CP-226 的 Omiganan,前者可以用于预防和治疗口腔黏膜炎,后者在降低导管相关感染上具有重要作用。此外,还有多种抗菌肽正在进行临床前及临床试验的可行性研究。临床试验的可喜成果充分证明将这些防御肽作为直接抗微生物剂应用到局部治疗上能够有效地阻止多种病原菌的感染。但是,抗菌肽在应用上还有很多局限性,除了成本高外,主要还有未知的药效动力学和毒理学(包括潜在免疫毒性),这些问题都有待解决。而对于人工合成的小阳离子肽来说,因为合成比较容易,并且能够诱发多种形式的免疫防御,因此,将其制成抗感染药剂将是治疗感染的一个非常可取的手段。

5 结 论

耐药微生物的出现对人类健康提出了挑战,开发出新型诊疗制剂迫在眉睫。因为抗菌肽可以不直接作用于病原微生物,而是通过调节多种炎症介质来清除病原微生物,使得它成为首选的抗感染药剂。另外,抗菌肽能够巧妙地调节宿主先天免疫反应,抑制恶化的炎症反应,而保持有积极意义的炎症反应,并起始、发展和扩大特异的适应性免疫反应,从而预防和治疗感染。因此,进一步对天然抗菌肽的功能机制和可能存在的应用进行研究,并将人工合成的抗菌肽发展为抗感染的生物制剂或具有选择性调节急性和/或慢性炎症功能的调节因子,将会为感染性疾病的治疗带来新的契机。

参考文献

- [1] Steiner H, Hultmark D, Engstrom A, et al. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 1981, 292(5820): 246 ~ 248
- [2] Ziv Oren, Yechiel Shai. A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from moose sole fish *pardachirus marmoratus*. *Eur J Biochem*, 1996, 237(1): 303 ~ 310
- [3] Matsuzaki K. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1376(3): 391 ~ 400
- [4] Peyrin-Biroulet L, Chamaillard M. NOD2 and defensins: translating innate to adaptive immunity in Crohn's disease. *J Endotoxin Res*, 2007, 13(3): 135 ~ 139
- [5] Hilpert K, Elliott M R, Volkmer-Engert R, et al. Sequence requirements and an optimization strategy for short antimicrobial peptides. *Chem Biol*, 2006, 13(10): 1101 ~ 1107

- [6] Golec M. Cathelicidin LL-37; LPS-neutralizing, pleiotropic peptide. *Ann Agric Environ Med*, 2007, 14(1):1~4
- [7] Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, et al. Potential therapeutic role of cationic peptides in three experimental models of septic shock. *Antimicrob. Agents Chemother*, 2002, 46(7): 2132~2136
- [8] Chertov O, Michiel D F, Xu L, et al. Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J Biol Chem*, 1996, 271(6): 2935~2940
- [9] Mookherjee N, Hancock R E. Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64(7-8): 922~933
- [10] Scott M G, Rosenberger C M, Gold M R, et al. An alpha-helical cationic antimicrobial peptide selectively modulates macrophage responses to lipopolysaccharide and directly alters macrophage gene expression. *J Immunol*, 2000, 165(6): 3358~3365
- [11] Mookherjee N, Brown K L, Bowdish D M, et al. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *J Immunol*, 2006, 176(4): 2455~2464
- [12] Mookherjee N, Wilson H L, Doria S, et al. Bovine and human cathelicidin cationic host defense peptides similarly suppress transcriptional responses to bacterial lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol*, 2006, 80(6): 1563~1574
- [13] Davidson D J, Currie A J, Reid G S, et al. The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *J Immunol*, 2004, 172(4): 1146~1156
- [14] Tjabringa G S, Ninaber D K, Drijfhout J W, et al. Human cathelicidin LL-37 is a chemoattractant for eosinophils and neutrophils that acts via formyl-peptide receptors. *Int Arch Allergy Immunol*, 2006, 140(2): 103~112
- [15] Huang H J, Ross C R, Blecha F. Chemoattractant properties of PR-39, a neutrophil antibacterial peptide. *J Leukoc Biol*, 1997, 61(5): 624~629
- [16] Agerberth B, Charo J, Werr J, et al. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*, 2000, 96(9): 3086~3093
- [17] Lillard J W Jr, Boyaka P N, Chertov O, et al. Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins. *PNAS*, 1999, 96(2): 651~656
- [18] Bowdish D M, Davidson D J, Speert D P, et al. The human cationic peptide LL-37 induces activation of the extracellular signal-regulated kinase and p38 kinase pathways in primary human monocytes. *J Immunol*, 2004, 172(6): 3758~3765
- [19] Chen X, Niyonsaba F, Ushio H, et al. Human cathelicidin LL-37 increases vascular permeability in the skin via mast cell activation, and phosphorylates MAP kinases p38 and ERK in mast cells. *J Dermatol Sci*, 2006, 43(1): 63~66
- [20] McPhee J B, Hancock R E. Function and therapeutic potential of host defence peptides. *J Pept Sci*, 2005, 11(11): 677~687
- [21] Hancock R E, Sahl H G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(12): 1551~1557
- [22] Komatsuzawa H, Ouhara K, Kawai T, et al. Susceptibility of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to defensins and potential therapeutic use of defensins in oral diseases. *Curr Pharm Des*, 2007, 13(30): 3084~3095

Multiple Roles of Antimicrobial Peptides in Host Defence

SHI Chun-lin^{1,2} WANG Yun-feng^{1,2} SHI Xing-ming² WANG Mei² SUN Yan^{1,2} TONG Guang-zhi³

(1 The College of Graduate, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

(2 Division of Avian Infectious Diseases, National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology,

Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

(3 Shanghai Institute of Animal Parasitology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200232, China)

Abstract Cationic antimicrobial peptides are produced by all organisms, from plants and insects to human beings, as a major part of their immediately effective, nonspecific defences against infections. Although many demonstrate direct antimicrobial activity against bacteria, fungi, eukaryotic parasites and/or viruses, it has been established that antimicrobial peptides have a key modulatory role in the interface of innate and adaptive immunity. More recent evidence suggests that antimicrobial peptides are effective adjuvants, which can be synergistic with other immune effectors, initiate the adaptive response, support wound healing, induce or modulate the chemokine and cytokine production, and inhibit the proinflammatory responses of host cells. In addition, the mechanisms of action are being unraveled, which support more effective implementation of derivatives of these endogenous peptides as therapeutic agents in overcoming infectious diseases.

Key words Innate immunity Host defence Antimicrobial peptides