

人防御素的研究进展

彭 力¹ 徐志南^{1*} 方向明² 吴金民² 岑沛霖¹

¹(浙江大学生物工程研究所,杭州 310027)

²(浙江大学医学院附属邵逸夫医院中心实验室,杭州 310016)

摘 要 人防御素是近年发现的人体内重要的内源性抗生素,已引起国内外生物和医学研究者的日益重视。这里综述了人防御素的组织分布、分子生物学特点、作用机理、医学及药用价值等方面的研究进展,对采用基因重组方法生产人防御素的方法进行了评述,并展望了防御素的应用前景和发展趋势。

关键词 防御素,抗菌肽

中图分类号 R34 Q78 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2003)03-0261-06

生长在充满各种微生物的环境中的植物、非脊椎动物及脊椎动物等各物种分别具有各自的防御机制来抵御有害微生物的侵害。在它们的体内有一类参与机体最初防御活动的小分子肽,近年来这类具有防御能力的肽引起了国际学术界的广泛关注,这些具有一定的抗菌谱的肽被称为抗菌肽(Antimicrobial peptides)。防御素(Defensin)是一类分子量约在4kD左右的阳离子抗菌肽,普遍分布于哺乳动物、昆虫及植物体内,通常含有6个或8个半胱氨酸残基,形成3个或4个分子内二硫键,是极为重要的一类内源性抗生素(Endogenous antibiotics)。根据半胱氨酸残基位置及二硫键连接方式的不同,可将其分为 α 和 β 防御素两类^[1-4]。在分子进化上, β 防御素比 α 防御素更为古老^[2]。

人防御素(Human defensin)属于抗菌肽家族^[1],是分子量4~5kD的阳离子短肽,含保守的6个半胱氨酸残基,形成3个典型的分子内二硫键。迄今为止,相继发现了6种人 α 防御素(HNP-1~4,HD-5,HD-6)^[5-10]和4种人 β 防御素(HBD-1~4)^[11-15]。

1 人防御素的组织分布

上世纪80年代,在中性粒细胞(Neutrophil cell)中相继发现了HNP-1~4等人 α 防御素,称之为髓源性防御素(Myeloid defensins)。HNP-1~3约占中性粒细胞中总蛋白含量的5%~7%,为嗜苯胺蓝粒(Azurophil granule)蛋白含量的30%~50%,占细胞防御素总量的99%^[16]。1992和1993年,在小肠潘氏细胞(Paneth cell)中分别发现了HD-5和HD-6,称为肠源性防御素(Enteric defensins),但在随后的研究中发现阴道上

皮细胞亦可合成HD-5^[17]。

1995年在血浆中分离得到人 β 防御素HBD-1^[11],并被证明在肾、阴道^[18]、唾液腺导管、胰腺腺泡^[19]等上皮细胞及牙龈、腮腺、口腔黏膜和舌^[20,21]中也有表达;1997年从银屑病皮损组织中发现了HBD-2,它在包皮、肺及气管中有较强的表达^[12],在牙龈黏膜中亦有表达^[21],在肾、子宫及唾液腺中表达较弱,而在小肠及肝脏中则未检测到表达^[12];2000年,从银屑病皮损组织中又发现了HBD-3^[13],几乎同时,另一个研究组采用基因组的搜索比对方法(BLAST)也发现并克隆到了HBD-3基因^[14],HBD-3在皮肤、扁桃腺有较强的表达,此外,呼吸道及生殖道上皮细胞^[13]、成年人心脏、骨骼肌、女性胸腺、食道、口腔黏膜、气管和胎盘膜^[14]中均有表达;2001年,通过高通量基因组序列比对(BLAST search in HTG)的方法,第四种人 β 防御素——HBD-4的基因被发现,进而被克隆,检测到的HBD-4的最强表达位置是在睾丸中,在胃窦中亦有很高的表达,而在子宫、中性粒细胞、甲状腺、肺及肾中仅有微弱的表达,与其它人 β 防御素不同,HBD-4的表达仅发现于少数的几个组织^[15]。

2 人防御素的分子生物学特征

2.1 分子结构

成熟的人 α 防御素由29~50个氨基酸残基组成,均为单链,富含精氨酸,有6个位置保守的半胱氨酸残基,其中1-6,2-4,3-5分别相连,形成3对二硫键(见图1)。在4个髓源性防御素中,HNP-1和HNP-3均为30个氨基酸,两者仅在N端的第一个氨基酸有所区别,其余氨基酸组成与排列完全相

收稿日期 2002-09-30,修回日期 2003-01-16。

基金项目 国家自然科学基金(No. A30070854 & 20276066)和浙江省重点科技项目基金(No. 413491030J30007001103241)资助。

* 通讯作者。 Tel 86-571-87951220, Fax 86-571-87951358, E-mail: znxu@zju.edu.cn

同。HNP-2 只比前两者少了 N 端的一个氨基酸,其余部分完全相同。因此,被认为可能是由 HNP-1 和/或 HNP-3 翻译后加工而来的^[22]。HNP-4 由 35 个氨基酸残基组成,与前两者相差较大,只有 32% 的氨基酸序列一致性(Identity)^[23]。两个肠源性防御素则相对较长,分别由 45(HD-5)和 50(HD-6)个氨基酸组成,两者的氨基酸序列一致性为 16.7%。

成熟的人 β 防御素由 41 ~ 50 个氨基酸残基组成,在 6 个保守的半胱氨酸残基中,1-5, 2-4, 3-6 分别相连,形成 3 对二硫键(见图 2)。HBD-4 与 HBD-1 ~ 3 相比,在第二和第三个半胱氨酸之间少了一个氨基酸残基(在小鼠 β 防御素, mBD-4 和 mBD-3 中亦发现了同样的特点)。同样,在第四和第五个半胱氨酸之间亦少了一个氨基酸残基。以上改变预示着在将来有可能发现的新的人 β 防御素中,半胱氨酸残基之间的距离将出现新的变化,而且,这些分子在一级结构上的差别可能导致三级结构的某些不同,从而暗示了它们在对抗各种致病微生物时的抗菌活性将出现区别^[15]。

尽管人 α 与人 β 防御素的氨基酸序列有所差别,但在三维结构上,它们都是由三条 β 折叠片和一个 α 螺旋组成的双歧性分子。

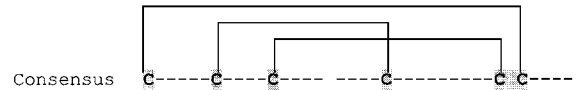
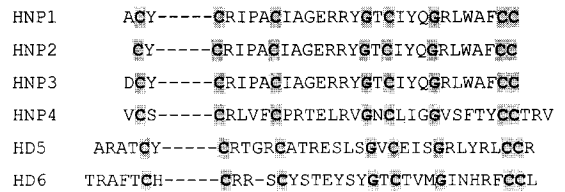


图 1 人 α 防御素的分子结构

Fig. 1 Molecular structure of human α -defensin

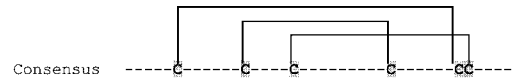


图 2 人 β 防御素的分子结构

Fig. 2 Molecular structure of human β -defensin

2.2 基因结构及其定位

人防御素的基因名称、大小及在染色体上的定位情况^[24]见表 1。

表 1 人防御素的基因

Table 1 Genes of human defensins

Defensin	HNP-1	HNP-2	HNP-3	HNP-4	HD-5	HD-6	HBD-1	HBD-2	HBD-3	HBD-4
Gene	DEFA1	—	DEFA3	DEFA4	DEFA5	DEFA6	DEFB1	DEFB2	DEFB3	DEFB4
Location	8p23.2-p23.1	—	8pter-p23.3	8p23	8pter-p21	8pter-p21	8p23.2-p23.1	8p23.1-p22 ^[25]	8p23	8p23.1-p22

HNP-2 的基因至今还没有被找到,由于它仅比 HNP-1 和 HNP-3 少一个 N 端的氨基酸,故被认为可能是由 HNP-1 和/或 HNP-3 翻译后加工而来的^[22, 26]。这样,所有现已发现的人防御素基因都被定位在了 8 号染色体短臂上的一个相对集中的区域(8pter-p21)。

在人 α 防御素中,3 个髓源性防御素的基因(DEFA1、DEFA 3、DEFA 4)均在 3 kb 左右,均由两个内含子和三个外显子组成。三个外显子分别相应于 5' 非翻译区(Untranslated region)、信号肽/原片段(Signal peptide/Propiece)和成熟肽(Mature peptide)^[27];另外两个肠源性防御素的基因(DEFA5、DEFA6)大小分别为 3.7 kb 和 3.0 kb,与前三者不同,它们由一个内含子和共同编码了信号肽、原片段和成熟肽的两个外显子组成^[28, 29]。

在人 β 防御素中,HBD-1 的基因(DEFB1)约为 7.0 kb,有一个内含子和两个相对较小的外显子,第一个外显子编码信号肽和原片段,第二个则编码成熟肽^[30];HBD-2 的基因(DEFB2)的内含子则比前者小得多,仅为 1.6 kb,两个外显子分别为 81 bp 和 238 bp。与 DEFB1 不同,它的一个外显子编码信号肽,另一个编码原片段和成熟肽^[31];HBD-3 的基因(DEFB3)位于与其同向转录的 DEFB2 上游约 13 kb 处,亦有两个外显子^[13, 14];HBD-4 基因(DEFB4)的两个外显子被一个约 4.5 kb 的内含子所分隔,一个外显子编码大部分信号肽序

列,信号肽的剩余部分加原片段和成熟肽则由另一个外显子所编码^[15]。

2.3 基因的表达调控

防御素基因的表达方式有组成性表达(Constitutive expression)和诱导表达(Inducible expression)两种。

人 α 防御素的表达为组成性表达。HNP-1 ~ 4 在中性粒细胞分化成熟前即已合成,并储存于胞浆颗粒中,其基因在生理情况下成熟的粒细胞中不能被诱导表达^[1]。HD-5 和 HD-6 是在小肠潘氏细胞内组成性表达的^[17],与细胞的发育同步^[29]。

已发现的 4 种人 β 防御素中,HBD-1 在上皮细胞中为组成性表达^[18],其它三种除组成性的基础表达外还可被诱导表达^[32, 14, 15],例如:HBD-2 的表达可以被 TNF- α 、IL-1 β 、LPS 及细菌等多种原炎剂(Proinflammatory agents)所诱导^[32];HBD-3 的表达可被 TNF- α 、IL-1 β 、IFN γ 及细菌所诱导^[13, 14];HBD-4 的表达可被豆蔻酰佛波醇乙酯(PMA)所诱导^[15]。进一步的研究表明,它们被诱导的机理各不相同:在 HBD-2 基因的上游及内部各发现了两个 NF- κ B 核因子 κ B,一个重要的炎症介导因子,可接受 LPS 及原炎细胞因子的刺激而介导转录的结合位点,它们被认为在 HBD-2 的诱导表达中起了主要作用^[31, 32];在 HBD-3 基因上游相当长的距离(约 2900bp)内和其内含子中,虽然没有发现 NF- κ B 的结合位点,但却发现了与诱

导表达关系密切的激活蛋白(Activator protein-1, AP-1)及 IFN γ 、GM-CSF、NF-IL-6 等细胞因子的应答原件(Response elements), HBD-3 mRNA 可被 IL-1 β 大量诱导表达,说明 IL-1 可以激活其它转录调节通路,或者在更远处有 NF- κ B 的应答原件(也许就是 HBD-2 基因 5' 端的 NF- κ B 的结合位点^[14]);对 HBD-4 基因的分析表明,在它的启动子区域内既没有 NF- κ B 的结合位点也没有 STAT 结合位点(IFN γ 的应答原件),这和 HBD-4 不能被 IL-1 α 、IL-6、IFN γ 和 TNF- α 等细胞因子诱导表达的实验结果是吻合的。但在 PMA 的诱导下, HBD-4 的表达量可提高 60 倍,其表达也可被肺炎链球菌(*S. Pneumoniae*)和热失活的铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)所诱导,由于 PMA 是蛋白激酶 C(PKC)的激活剂,而且 PKC 的某些同工酶在某些种类的细胞中也可被 LPS 及感染所激活,因此可以推测是 PKC 介导了 HBD-4 的诱导表达^[15];对 HBD-1 基因的分析则没有发现上述的结合位点及应答原件^[30]。

2.4 翻译后修饰

人防御素中,髓源性防御素的翻译后加工过程研究得较为透彻。细胞首先合成较大的前体肽(Prepropeptide),经过逐步翻译后修饰及酶解后形成成熟肽,最终转运到特定的细胞器内。防御素前体肽由氨基末端的信号序列、带负电荷的原片段和羧基末端带正电荷的成熟肽组成^[26]。以 HNP-1 为例进行说明:首先是 94 个氨基酸残基的前体肽被合成,在 N 端的 19 个氨基酸残基的信号肽引导下,进入内质网中。随后,信号肽很快被切除,形成 75 个氨基酸残基的 HNP-1 原(proHNP-1)(它呈电中性,不具备抗菌活性,被认为是在翻译后加工过程中的一个很重要的过渡分子^[26])再经过多步加工,将其逐步裂解,最终生成具备抗菌活性的阳离子的成熟 HNP-1^[33]。此外,从人回肠肠膀胱术后尿液及回肠黏膜中分离纯化的 HD-5 肽包含氨基末端长度不等的多种形式^[34],从人的尿液及血液中分离得到的 HBD-1 也有长度从 36-47 个氨基酸不等的多种形式,这些证明肠源性防御素和人 β 防御素也曾以前体分子的形式被合成^[18]。

3 人防御素的抗菌活性及其机理

3.1 抗菌活性

人防御素具有广泛的抗菌谱及极强的抗菌活性,但其活性大多受高盐浓度的抑制(HBD-3 除外),现将其小结于表 2。

在对 HBD-4 的研究中发现, HBD-4 与溶菌酶(Lysozyme)共同作用于 *S. carnosus* TM300 的实验中表现为协同作用(FIC < 0.5);而 HBD-4 与 HBD-3 共同作用于 *S. carnosus* TM300 及 *E. coli* BL21 的实验中表现为强相加作用(FIC ~ 0.6)但 HBD-4 与氨基青霉素共同使用时表现为无关作用(FIC ~ 1)^[15]。HBD-2 也被证明与乳铁蛋白(Lactoferrin)和溶菌酶有协同作用^[38]。

3.2 作用机理

迄今为止,关于人防御素等阳离子抗菌肽的抑菌作用机理尚不完全清楚,但有间接证据表明,在微生物的细胞膜上形成孔道是一个十分重要的环节,双歧性的结构特点为它们

与膜的界面相结合提供了可能^[40]。为了形成细胞膜上孔道,抗菌肽的结构必须满足三个条件:1. 能够与膜相结合;2. 能够在膜内聚集;3. 能够组成孔道结构^[41]。阳离子抗菌肽与细胞膜的结合方式一般认为有如下两种可能:一是与膜上的双脂层相作用,因为有实验表明它们可能加快脂质体的水性内含物的外流速率;二是与膜上带负电荷的磷脂相通过静电作用相结合,因为抗菌肽带有正电荷,电荷间的静电引力在远距离即可发生作用,这也解释抗菌肽对外单层膜中有两性离子存在的哺乳动物细胞几乎无结合作用^[40]。人们普遍认为防御素以多聚体的方式发生作用,使它们在膜内聚集以致形成孔道结构^[3, 39],如已发现了人 α 防御素^[41]、HBD-2^[42]和 HBD-3^[43]以二聚体或多聚体的存在形式。

不同的抗菌肽可能有不同的作用方式,同一种抗菌肽与不同微生物作用时机理也可能有所差异^[40]。关于作用机理的研究还有很多悬而未决的问题,如为什么有些微生物特别敏感,而其它种类的微生物则不太敏感或仅在抗菌肽浓度很高的环境下才受到抑制^[41]? 抗菌肽到底是如何破坏膜结构的,是否膜的破坏就足以达到了对微生物的抑制作用,或者它们在细胞内还要作用于其它的目标(如 DNA 或/和蛋白质的合成)^[40, 41]?

4 医学价值及其基因工程生产

4.1 医学及药用价值

人防御素参与机体防御活动并与许多疾病的发生、发展及治疗相关。在临床上,正常人体内 HNP-3 缺失很常见(约占所测试者的 10%),但也有少数人 HNP-1 ~ 3 全部缺失,他们体内的中性粒细胞数量比正常人约低 10%,这种现象被称为“特异性颗粒缺乏”(Specific Granule Deficiency),此类病人会频繁地受到一些普通细菌的感染^[3]。HBD-2 被发现与皮肤疾病及肺部感染关系密切:银屑病(亦称牛皮癣, Psoriasis)患者的皮肤中, HBD-2 的含量被证明大大高于常人(HBD-3 亦是从此类病人的皮屑中发现的^[13]),这类病人的皮肤极少受到感染,肺囊性纤维性病变(Cystic fibrosis)的病人很容易发生肺部感染,可能与其肺黏膜的防御机能下降有关,由于此类病人的上皮细胞中盐浓度很高,因而 HBD-2 的杀菌作用受到抑制^[44, 32]。在胎盘膜中有 HBD-3 表达,说明它在孕期的胎儿与母体的共同防御中起一定作用^[14]。HBD-4 的表达仅限于少数组织,加之其抗菌谱的特性,暗示着它在所表达的组织中会发挥特定的作用:它被检测到的最高表达是在睾丸中,这也许正是睾丸很少因细菌感染而发炎的原因^[15]。人防御素还是非成熟树突状细胞及记忆 T 细胞的趋化因子,被认为在人体先天及后天防御机制联系中起重要作用^[4]。最近, ZHANG Lin-Qi 等的研究指出, HNP-1、HNP-2 和 HNP-3 有抗艾滋病病毒(HIV-1)的作用^[45],这项研究给艾滋病这个严重威胁人类健康的世界性难题的解决带来了新的曙光。

由于防御素强大的抑菌功能,其药用价值自然不容忽视^[12, 43, 45]。虽然各种人防御素的抑菌谱及效果各不相同,但多种防御素之间或防御素与其它抗菌剂的联合使用则可能

取得更好的效果^[15,38]。也有人提出在深入了解防御素的表达调节机制的前提下,设计药物来特异地调节受感染器官的防御素表达,从而达到治疗的目的^[32]。

在后抗生素时代的今天,各种传统抗生素的大量应用在治疗病人的同时也给我们带来了多种多样的抗药性微生物,

耐药性微生物给人类健康带来了新的威胁。由于人防御素独特的作用机理,可能避免致病微生物对其产生耐药性^[12,32],因此具有良好的药用前景,将成为对付耐药性微生物感染的新型武器,开辟抗生素发展的新天地。

表 2 人防御素的抗菌谱

Table 2 Antimicrobial spectrum of human defensins

Defensin	Antimicrobial spectrum		Peptide concentration	High Salt concentration sensitive	References
HNP-1, HNP-2, HNP-3	<i>E. coli</i>	G ⁻	10.0μg/mL (LD ₅₀)	Yes	[8][35][36]
	<i>S. faecalis</i>	G ⁺	> 10μg/mL (LD ₅₀)		
	<i>C. albicans</i>	Yeast	2.2μg/mL (LD ₅₀)		
	Fungi enveloped viruses	—	—		
HNP-4	<i>E. coli</i>	G ⁻	0.085μg/mL (LD ₅₀)	Yes	[8][35]
	<i>S. faecalis</i>	G ⁺	2.35μg/mL (LD ₅₀)		
	<i>C. albicans</i>	Yeast	0.50μg/mL (LD ₅₀)		
HD-5	<i>L. monocytogenes</i>	G ⁺	—	Yes	[35][37]
	<i>E. coli</i>	G ⁻	—		
	<i>S. typhi</i>	G ⁻	—		
HD-6	—	—	—	Yes	[35]
HBD-1	<i>E. coli</i>	G ⁻	31μg/mL (MIC)	Yes	[18][38][39]
HBD-2	<i>E. coli</i>	G ⁻	10μg/mL (LD ₉₀)	Yes	[12]
	<i>P. aeruginosa</i>	G ⁻	10μg/mL (LD ₉₀)		
	<i>C. albicans</i>	Yeast	25μg/mL (LD ₉₀)		
	<i>S. aureus</i>	G ⁺	100μg/mL (< 10 ² CFU/mL)		
	<i>S. aureus</i>	G ⁺	12.5μg/mL (< 10 ² CFU/mL)		
HBD-3	<i>S. pyogenes</i>	G ⁺	12.5μg/mL (< 10 ² CFU/mL)	No	[13]
	<i>P. aeruginosa</i>	G ⁻	—		
	<i>E. coli</i>	G ⁻	6μg/mL (< 10 ² CFU/mL)		
	<i>C. albicans</i>	Yeast	—		
	vancomycin-resistant <i>E. faecium</i>	G ⁺	12μg/mL (< 10 ² CFU/mL)		
	multiresistant <i>S. aureus</i>	G ⁺	25μg/mL (< 10 ² CFU/mL)		
	<i>E. coli</i> BL21,	G ⁻	—		
<i>Burkholderia cepacia</i>	G ⁻	—			
HBD-4	<i>S. cerevisiae</i> ,	Yeast	> 100μg/mL (MIC)	Yes	[15]
	<i>S. aureus</i>	G ⁺	—		
	<i>S. pneumoniae</i>	G ⁺	—		
	<i>S. carnosus</i> TM300	G ⁺	4.5μg/mL (MIC)		
	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	G ⁻	4.1μg/mL (MIC)		

注 :G⁺ :革兰氏阳性菌 ;G⁻ :革兰氏阴性菌 ;LD₅₀ :使菌落形成单位(CFU)数减少 50%的剂量 ;

LD₉₀ :使菌落形成单位数减少 90%的剂量 ;MIC :最小抑制浓度 ;

CFU/mL :菌落形成单位/毫升 ;— :未检测

4.2 基因工程生产人防御素

基于来源及成本等方面考虑,基因工程无疑是大批量生产人防御素的首选方法。Piers 等曾在大肠杆菌中对 HNP-1 进行过融合表达的尝试^[46];Valore 等在昆虫细胞中表达了 HBD-1 用以实验研究^[18];HBD-2 也曾被 Bals 等在昆虫细胞中重组表达^[38];Harder 等也先后将 HBD-2(私人通信)及 HBD-3^[13]在大肠杆菌中进行了融合表达;在国内,张满朝等研究了 HNP-1 在大肠杆菌^[47]及烟草中的表达^[48,49];唐彬等进行了 HNP-1 基因在气管上皮细胞传染及表达研究^[50]。

本实验室曾在大肠杆菌中成功地融合表达了 HBD-2^[51],通过对大肠杆菌表达系统的深入研究,目前我们已经将融合蛋白的表达水平提高到菌体总蛋白的 40% 以上(未发表);本室还对 HBD-2 在其它表达系统(如酵母菌、枯草杆菌)中的表达进行了研究,并初步证明 HBD-2 在其中亦有表达(未发表);此外,鉴于在基因工程菌的体内表达中 HBD-2 的抗菌特性对宿主有潜在的威胁,本室目前正在进行无细胞体系(Cell-free system)合成 HBD-2 的研究(未发表)。我们希望通过对人 HBD-2 的基因工程生产的研究,获得人防御素乃至阳离子

子抗菌肽家族的表达经验,进而为此类内源性抗菌肽的基因工程生产奠定基础。我们相信,在国内外研究者的共同努力下,基因工程的方法生产人防御素必将在基础研究、临床医学及医药工业中发挥重要作用。

5 人防御素的前景展望

基因组学与生物信息学的发展,给人防御素的研究注入了新的活力。人 α 防御素、HBD-1、HBD-2及Harder小组的HBD-3的发现都是采用传统的方法,先从人体分离出蛋白质,继而进行分子及基因水平的研究^[5-13],但Jia的小组发现HBD-3却是采用比对的方法首先在人类基因组数据库中直接找到了HBD-3基因,然后再在人体组织中克隆得到的^[14]。可以说,这项工作实现了人防御素研究上的范式转换(Paradigm Shift),这是在人类基因组计划已经初步完成、新的交叉学科(基因组学与生物信息学)不断发展条件下的必然结果。其后,2001年底(发表于2002年),University of Iowa的Welsh研究组利用HMMER(一种计算搜索工具)结合BLAST比对,找到了28个新的人 β 防御素基因,初步分析表明,其中的12个已被转录,同时他们也发现了43个小鼠 β 防御素基因,初步分析认定了其中的14个被转录^[52]。这项工作显示了基因组搜索对发现有保守结构域的新基因的强大威力,也代表了人防御素研究工作的一个新起点。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Ganz T, Weiss J. Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia. *Seminars in Hematology*, 1997, **34**(4): 343 - 354
- [2] Lehrer R I, Ganz T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Current Opinion in Immunology*, 1999, **11**: 23 - 27
- [3] Ganz T, Selsted M E, and Lehrer R I. Defensins. *European Journal of Haematology*, 1990, **44**: 1 - 8
- [4] Yang D, Chertov O, Bykovskaia S N *et al.* β -Defensins: Linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*, 1999, **286**: 525 - 528
- [5] Ganz T, Selsted M E, Szkarek D *et al.* Defensins: natural peptide antibiotics of human neutrophils. *Journal of Clinical Investigation*, 1985, **76**: 1472 - 1435
- [6] Selsted M E, Harwig S S, Ganz T *et al.* Primary structures of three human neutrophil defensins. *Journal of Clinical Investigation*, 1985, **76**: 1436 - 1439
- [7] Singh A, Bateman A, Zhu Q Z *et al.* Structure of a novel human granulocyte peptide with anti-ACTH activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1988, **155**: 524 - 529
- [8] Wilde G C, Griffith J E, Marra M N. Purification and characterization of human neutrophil peptide 4, a new member of the defensin family. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, **264**: 11200 - 11203
- [9] Jones D E, and Bevins C L. Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 1992, **267**: 23216 - 23225
- [10] Jones D E, Bevins C L. Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. *FEBS Letters*, 1993, **315**: 187 - 192
- [11] Bensch K W, Raida M, Mägert H J *et al.* The hBD-1: A novel beta-Defensin from human plasma. *FEBS Letters*, 1995, **368**: 331 - 335
- [12] Harder J, Bartels J, Christophers E *et al.* A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, 1997, **387**: 861
- [13] Harder J, Bartels J, Christophers E *et al.* Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**(8): 5707 - 5713
- [14] Jia H P, Schutte B C, Schudy A *et al.* Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene*, 2001, **263**: 211 - 218
- [15] Garcia J R, Krause A, Schulz S *et al.* Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB Journal*, 2001, **15**: 1819 - 1821
- [16] Ganz T, and Lehrer R I, Defensins. *Current Opinion in Immunology*, 1994, **6**: 584 - 589
- [17] Quayle A J, Porter E M, Nussbaum A A *et al.* Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *American Journal of Pathology*, 1998, **152**: 1247 - 1258
- [18] Valore E V, Park C H, Quayle A J *et al.* Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *Journal of Clinical Investigation*, 1998, **101**(8): 1633 - 1642
- [19] Zhao C Q, Wang I, and Lehrer R I. Widespread expression of beta-defensin HBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Letters*, 1996, **396**: 319 - 322
- [20] Krisanaprakornkit S, Weinberg A, Perez C N *et al.* Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infection and Immunity*, 1998, **66**: 4222 - 4228
- [21] Mathews M, Jia H P, Guthmiller J M *et al.* Production of beta-defensin antimicrobial peptides by oral mucosa and salivary glands. *Infection and Immunity*, 1999, **67**: 2740 - 45
- [22] Ganz T, Lehrer R I. Antimicrobial peptides of vertebrates. *Current Opinion in Immunology*, 1998, **10**: 41 - 44
- [23] Ihi T, Nakazato M, Mukae H *et al.* Elevated concentrations of human neutrophil peptides in plasma, blood, and body fluids from patients with infections. *Clinical Infectious Diseases*, 1997, **25**: 1134 - 1140
- [24] The Human Genome, *GenBank*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>.
- [25] Harder J, Siebert R, Zhang Y *et al.* Mapping of the gene encoding human beta-defensin-2(DEFB2) to chromosome region 8 p22-p23.1. *Genomics*, 1997, **46**: 472 - 475
- [26] Ganz T. Biosynthesis of defensins and other antimicrobial peptides. 1994 *Antimicrobial peptides*. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 186), pp. 62 - 76
- [27] Linzmeier R, Michaelson D, Liu L *et al.* The structure of neutrophil defensin genes. *FEBS Letters*, 1993, **321**: 267 - 273
- [28] Jones D E, Bevins C L. Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 1992, **267**: 23216 - 23225
- [29] Mallow E B, Harris A, Salzman N *et al.* Human Enteric defensins. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, **271**: 4038 - 4045
- [30] Liu L, Zhao C, Heng H H Q *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**: 316 - 320
- [31] Liu L, Wang L, Jia H P *et al.* Structure and mapping of the human β -defensin HBD-2 gene and its expression at sites of inflammation. *Gene*, 1998, **222**: 237 - 244

- nal of Biochemistry & Cell Biology*, 1999, **31**: 645 – 651
- [33] Lehrer R I, Lichtenstein A K, Ganz T. Defensins : antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annual Review of Immunology*, 1993, **11**: 105 – 128
- [34] Porter E M, Poles M A, Lee J S *et al.* Isolation of human intestinal defensins from ileal neobladder urine. *FEBS Letters*, 1998, **434**: 272 – 276
- [35] Ganz T, Weiss J. Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia. *Seminars in Hematology*, 1997, **34**: 343 – 354
- [36] Lehrer R I, Ganz T. Endogenous vertebrate antibiotics : defensins, protegrins, and other cysteine-rich antimicrobial peptides. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1996, **797**: 228 – 239
- [37] Porter E M, Dam E V, Valore E V *et al.* Broad-spectrum antimicrobial activity of human intestinal defensin 5. *Infection and Immunity*, 1997, **65**: 2396 – 2401
- [38] Bals R, Wang X, Wu Z *et al.* Human β -defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *Journal of Clinical Investigation*, 1998, **102**: 874 – 880
- [39] Schröder J M, Epithelial peptide antibiotics. *Biochemical Pharmacology*, 1999, **57**: 121 – 134
- [40] Epand R M, Vogel H J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, **1462**: 11 – 28
- [41] Schröder J M. Epithelial antimicrobial peptides : innate local host response elements. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, 1999, **56**: 32 – 46
- [42] Hoover D M, Rajashankar K R, Blumenthal R *et al.* The structure of human β -defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, **275**: 32911 – 32918
- [43] Schibli D J, Hunter H N, Aseyev V *et al.* The solution structures of the human β -defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, **277**: 8279 – 8289
- [44] Liu L, Wang L, Jia H P *et al.* Structure and mapping of the human beta-defensin HBD-2 gene and its expression at sites of inflammation. *Gene*, 1998, **222**: 237 – 244
- [45] Zhang L Q, Yu W J, He T *et al.* Contribution of Human α -Defensin 1, 2, and 3 to the Anti-HIV-1 Activity of CD8 Antiviral Factor. *Science*, 2002, **298**: 995 – 1000
- [46] Piers K L, Brown M H, Hancock R E W. Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria. *Gene*, 1993, **134**: 7 – 13
- [47] ZHANG M (张满朝), ZHENG G (郑国锴). Expression of Human Defensin-I (HNP-1) in *E. coli*. *Chinese Biochemical Journal (生物化学杂志)*, 1997, **13**(3): 264 – 269
- [48] ZHANG M (张满朝), ZHENG G (郑国锴). Human Defensin-I (HNP-1) Expression in Tobacco: A Preliminary observation on Anti-TMV Activity of the Transgenic Tobacco Plants. *Acta Botanica Sinica (植物学报)*, 1997, **30**(6): 574 – 576
- [49] ZHANG M (张满朝), ZHENG G (郑国锴). Transient Expression on Human Defensin-1 (HNP-1) in Tobacco Protoplast. *Acta Biologica Experimentalis Sinica (实验生物学报)*, 1997, **30**(4): 209 – 211
- [50] TANG H (唐彬), HUANG N (黄宁), WU Q (吴琦) *et al.* Studies on the expression of transferred human α -defensin HNP1 gene in tracheal epithelial cells cultivated *in vitro*. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology (中华微生物学和免疫学杂志)*, 1999, **19**(6): 481 – 484
- [51] Fang X M, Peng L, Xu Z N *et al.* Cloning and expression of human beta-defensin-2 gene in *Escherichia coli*. *Protein and Peptide Letters*, 2002, **9**: 31 – 37
- [52] Schutte B C, Mitros J P, Bartlett J A *et al.* Discovery of five conserved β -defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2002, **99**: 2129 – 2133

Advances in the Research of Human Defensins

PENG Li¹ XU Zhi-Nan^{1*} FANG Xiang-Ming² WU Jin-Min² CEN Pei-Lin¹

¹(Institute of Bioengineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

²(The Central Lab of Sir Run Run Shaw Hospital, School of Medical Science, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China)

Abstract Human defensin is a family of cationic antimicrobial peptides in human being. During the last two decades a series of endogenous α - and β -human defensins have been discovered. They are important components of the first barrier in human's body against the invasion of various microorganisms, and they are thought to play an important role in linking the innate and adaptive defense system of human being. The recent advances in the research of human defensins were reviewed, including their discovery, molecular and genetic properties, expression regulation, and mechanisms of antimicrobial activity. The possibility to produce human defensins via genetic engineering was also discussed. And the application outlook of human defensins in medicine and curing patients infected with antibiotics-resistant microbials was presented.

Key words human defensin, antimicrobial peptide

Received : 09-30-2002

This work was supported by the Grant from the National Nature Science Foundation of China (No. A30070854 & 20276066) and the Grant from the Department of Science and Technology, Zhejiang Provincial People's Government (No. 413491030J30007001103241).

* Corresponding author. Tel : 86-571-87951220 ; Fax : 86-571-87951358 ; E-mail : znxu@zju.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>