

• 综述 •

肠源性 α-防御素在炎症性肠病发病机制中作用的研究进展

唐丽群 刘志锋 苏磊

【关键词】 潘氏细胞 α-防御素； 炎症性肠病； 核苷酸结合寡聚化结构域 2； Wnt/翻译因子信号通路； 自噬体基因

防御素作为小肠腺泡底部潘氏细胞分泌的主要抗菌肽,具有广谱的杀菌、抗炎、抗病毒功能,对肠道的黏膜屏障功能和免疫功能都有非常重要的维持和调节作用。近年发现防御素和炎症性肠病(IBD)的发病联系紧密。现将近年来肠源性防御素在 IBD 发病机制中作用的研究进展进行综述,以期今后 IBD 的治疗提供一定的理论依据。

1 潘氏细胞 α-防御素

小肠作为营养物质消化和吸收的主要部位,是机体和病原微生物接触最广泛的区域,生理情况下保持肠腔定植的正常菌群和机会致病菌间的动态平衡可以不致病。除了小肠黏膜的屏障功能和先天性免疫外,潘氏细胞防御素的作用也十分重要。潘氏细胞是正常小肠黏膜上皮细胞中的一种,由腺泡基底部的小肠上皮干细胞分化而来,主要位于小肠腺泡基底部,可分泌大量抗菌颗粒,如防御素、溶酶体等,是肠道先天性免疫的重要效应器^[1]。肠源性 α-防御素是其中最丰富而且最有特征性的抗微生物肽,是一类不含糖链的碱性阳离子多肽家族,相对分子质量为 3 000~5 000。肠源性 α-防御素在生理情况下的近端小肠都可以表达,且含量随十二指肠—空肠—回肠逐渐增加,在生理情况下的结肠上皮细胞不表达;慢性炎症和寄生虫感染时浓度会大大增加,可能是机体为抵御细菌侵袭产生的一种替代性“应需而生”,从而引起潘氏细胞的转化^[2]。但目前该假说尚未得到证实。

目前人类已确定了 6 种 α-防御素,

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.05.019

基金项目:中国博士后科学基金项目(200902659);国家自然科学基金资助项目(81071529);广东省自然科学基金资助项目(10151001002000001)

作者单位:510010 广东,广州军区广州总医院全军热区损伤救治与创伤修复重点实验室

通信作者:苏磊,Email:slei_icu@163.com

其中 HNP1、HNP2、HNP3 和 HNP4 主要在中性粒细胞表达,HD5 和 HD6 主要在小肠潘氏细胞表达,后两种 α-防御素以前肽形式储存于分泌小泡中,依赖胰蛋白酶和金属蛋白酶基质裂解蛋白转化为有活性的成熟抗菌肽^[3]。小鼠 α-防御素(又称 cryptdin)仅限于由肠道的潘氏细胞分泌,需要基质金属蛋白酶-7(MMP-7)的蛋白水解才能在肠腔中从前体形式激活为有活性的抗菌肽^[3]。当前研究认为,肠源性 α-防御素具有广谱的杀菌、抗炎、抗病毒功能,在保护腺泡底部干细胞、维持肠道上皮屏障完整、调节肠道菌群平衡、防止病原微生物侵袭和作为化学趋化剂调节免疫效应细胞(如记忆性淋巴细胞和树突细胞)等方面有着十分重要的作用^[4-6]。最近有研究发现,α-防御素通过“ABCDE”机制来抑制革兰阳性菌释放的胆固醇依赖性细胞毒素形成孔道引起溶血,发挥防御素的其他生理功能(图 1)^[6-7]。

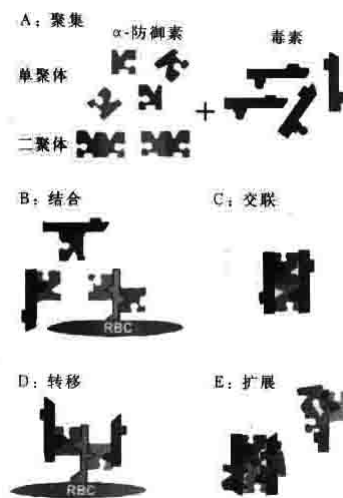


图 1 α-防御素的“ABCDE”机制示意图

α-防御素可通过聚集(A),在红细胞表面局部与细胞表面糖蛋白或毒素低聚体结合(B),形成二聚体和结合分子进行交联(C),改变毒素易结合的表面受体(D),然后扩展(E)至整个毒素表面,进一步防止毒素低聚形成孔道。

2 肠源性 α-防御素与 IBD 的关系

IBD 是一组病因不明的肠道炎症性疾病,包括克罗恩病(CD)和溃疡性结肠炎(UC)^[8]。近年来国内外 IBD 的发病率呈上升趋势,其疾病的病位、发展和个体治疗反应都不明确,发病主要与基因和环境等因素有关^[9-10]。菌群失调、组织炎症和上皮屏障功能受损是 IBD 的主要发病机制^[8,11],其中潘氏细胞防御素与 IBD 发病的密切联系得到了越来越多的关注。

目前认为 CD 的发病机制是由于肠腔黏膜化学抗菌屏障受损,细菌易感性增加,肠腔微生物入侵引起免疫系统进行性激活,诱发炎症;同时机体对肠腔菌群的耐受性也降低^[12-13],潘氏细胞 α-防御素的异常表达或分泌可能是主要病理因素。回肠 CD 患者的潘氏细胞 α-防御素 HD5、HD6 的 mRNA 和蛋白表达均显著下调^[13-14],而潘氏细胞分泌小泡的数目和潘氏细胞其他产物水平与正常对照组相似或有所增加^[15],提示 α-防御素水平减少主要与潘氏细胞功能而不是数量有关。结肠 CD 主要表现为黏膜 β-防御素诱导受损,部分是因为 β-防御素的基因集落复制数量减少^[16]。部分结肠 CD 患者 HD5 和 HD6 的表达增加,可能是由于炎症诱导了结肠潘氏细胞转化所引起的^[17]。

在 UC 的发病中 α-防御素表达也显著增高^[14,18],与白细胞介素(如 IL-1β、IL-8)水平相关^[19-20],即使患者的内镜和组织学结果正常,也存在基因表达改变^[19]。可能是由于通道下游的改变引起核转录因子-κB(NF-κB)激活,导致核苷酸结合寡聚化结构域 2/受体相互作用的丝氨酸苏氨酸激酶 2(NOD2/RIP2)表达升高,诱发信号“瀑布”调节抗菌肽 HD5、HD6 表达升高^[19,21],部分也可能由于细胞因子直接作用于潘氏细胞和上皮细胞^[19]。抗菌肽和炎症细胞因子的表达上调很可能是互相作用诱导发生的。肠道炎症合并免疫激活是 UC 发病的主

要特点,而且仅对激素治疗有效的患者 α -防御素水平下降^[21],说明 α -防御素不仅在 UC 中可作为疾病活动程度指标,还可反映治疗效果。因此,增强和维持抗菌肽病原刺激和免疫耐受的微妙平衡是 IBD 患者今后治疗的关键。

3 肠源性 α -防御素与相关致病分子间的关系

肠源性 α -防御素的功能主要包括细菌识别方面的功能紊乱(NOD2);细胞基因谱,特别是分化、成熟和功能的调节[Wnt/翻译因子 4(TCF4)];以及胞吐或者自噬通路改变(ATG16L)三大类。NOD2 作为细菌胞壁肽二肽(MDP)的模式识别受体,在潘氏细胞表达,可以激活 NF- κ B^[15],调节先天性和后天免疫基因的翻译与表达。大量临床研究和犬齿类动物实验都发现,NOD2 基因与潘氏细胞防御素的缺乏相关^[13,18,22]。在 CD 发病中 NOD2 相对缺乏表现为移码突变和表达显著减少^[23]。回肠 CD 患者潘氏细胞 α -防御素 HD5、HD6 的 mRNA 和蛋白表达均显著下调^[13-14],而 NOD2 变异的 CD 患者 α -防御素翻译水平和合成水平也都显著减少^[16,24],而且这种水平的降低与 NOD2 3020insC 框架变异(SNP13)有关^[14]。HD5 和 HD6 的减少引起肠道抗菌能力下降,而 NOD2 截断的小鼠抵抗病原菌能力也明显减弱。但由于缺乏潘氏细胞培养模型,NOD2 缺乏和 α -防御素特异性减少的相关关系仍不明确。野生型 NOD2 的 CD 患者同样存在 HD5 和 HD6 的表达减少^[14],而且潘氏细胞 α -防御素的启动子区域并没有发现 NF- κ B 的结合位点^[24],提示 NOD2 和防御素缺乏是相对独立的。最近 Simms 等^[25]的研究发现,回肠 CD 患者 HD5 mRNA 表达减少与 VIL1(上皮细胞内容物的一个指标,可反映上皮细胞完整性)水平和潘氏细胞数量的减少呈显著正相关,提示 α -防御素的特异性减少与炎症损伤所引起的肠道表皮细胞丢失有关。研究还发现,NOD2 变异的 CD 患者黏膜 IL-6、IL-8 的 mRNA 表达减少,是通过模式识别受体介导的先天性免疫缺陷,与局部菌群失调引起的黏膜免疫反应缺陷有关^[26]。

Wnt 蛋白是分泌性形态基因,在胚胎发生时调节细胞分化。在细胞膜表面通过与 Frizzled 和 LRP5/6 两种受体结合成三聚体,阻止 β -连环蛋白降解复合物的

形成,游离 β -连环蛋白在胞质中积累到一定水平移入核,形成特异的活化转录因子 TCF/Lef,进而诱导相应靶基因的表达^[26]。Wnt 信号通路可通过复杂的基因编码调节干细胞分化成潘氏细胞,以及调节潘氏细胞的分布、分化和成熟^[27]。有条件切除实验小鼠的 Wnt 受体 Frizzled-5,结果会减弱基因裂解蛋白和潘氏细胞 α -防御素 cryptdin 的基因表达^[27]。 β -连环蛋白基因突变小鼠潘氏细胞系的分化严重受损,而且 β -连环蛋白 mRNA 水平的轻微减少都能严重干扰潘氏细胞,而对其他肠细胞的增殖影响不大^[28]。说明 Wnt 通路对潘氏细胞系非常重要。

TCF4 是 Wnt/ β -连环蛋白介导信号后早期潘氏细胞 α -防御素表达的分化和成熟的关键转录因子^[29],结合和直接调节潘氏细胞 α -防御素的启动子区域,直接调控其表达。由 TCF4 表达减少引起的 α -防御素表达下调与组织炎症以及 NOD2 状态无关^[29]。TCF4 启动子区域 rs3814570 变异,引起 TCF4 mRNA 表达减少,导致潘氏细胞 α -防御素减少是 CD 发病的主要因素^[29]。TCF4 水平下降 50% 可显著削弱小鼠潘氏细胞 α -防御素的表达及其相关的抗菌功能^[29]。因为 Wnt/TCF4 除能直接调节防御素的表达外,也在潘氏细胞的分化和成熟方面起主要作用,从而推断细胞分化损伤也可能是 CD 发病机制之一。如果这个假说得到证实,那么调节下源受损的效应器分子如 HD5、HD6 和调节细胞分化等的治疗可能成为今后新的治疗策略。

除 NOD2 和 Wnt/TCF4 外,自噬体基因 ATG16L 也可能与 CD 易感性和潘氏细胞防御素的功能相关。自噬体基因 ATG16L 是涉及编码处理胞内细菌自噬小体代谢途径的蛋白质。因为潘氏细胞依赖胞吐通路分泌储存的防御素等抗菌肽,如果胞吐作用被削弱,小肠的抗菌活性就会减少。Hampe 等^[22]在基因谱扫描中发现 ATG16L 的 SNP rs22418880 启动子罕见变异与欧洲 CD 的发生有关,但与 UC 无关,而且这一结果是可重复的;Fowler 等^[30]发现这一变异在回肠 CD 患者中更为明显。但日本和中国的研究目前还没有发现 ATG16L1 基因中有与 CD 易感性相关的 SNP 位点^[31-32]。

转基因小鼠部分切除潘氏细胞对宿主防御或肠道腺泡绒毛的形态和功能没

有影响^[33],提示在无特殊感染时潘氏细胞 α -防御素抗菌功能丢失可通过其他防御机制来补偿。双硫脲是用于检验 Cu、Ag、Pb、Hg 等的络合指示剂,可选择性破坏潘氏细胞,增加新生大鼠大肠杆菌的易感性^[34]。广谱抗菌药物如阿莫西林可永久下调潘氏细胞生成防御素的基因表达^[35]。如果这项研究在人类得到证实,可解释发展中国家滥用抗菌药物引起的无感染源性感染和 IBD 易感性增加的原因。Preet 等^[36]的研究从体内、体外、活体试验证实人工合成的 cryptdin 2 可显著增高沙门伤寒杆菌感染小鼠肝、脾和小肠的细菌清除率,而没有明显的肝、肾毒性;相对较高的脾脏细菌清除率说明防御素的杀菌作用可能是全身性的,推测防御素可通过提高巨噬细胞的杀菌能力和自身的直接杀菌来起作用。

4 结语

虽然 IBD 患者 α -防御素表达异常,但其水平改变是否是 IBD 的一个发病原因,或者只是疾病变化的一个结果还不明确。目前调节防御素水平和潘氏细胞的分化来治疗 IBD 和感染仅处于动物实验阶段,因此,关于肠源性 α -防御素在肠道疾病发病机制和临床治疗中的潜在价值尚有待今后进行进一步的研究。

参考文献

- [1] Porter EM, Bevens CL, Ghosh D, et al. The multifaceted Paneth cell. *Cell Mol Life Sci*, 2002, 59, 156-170.
- [2] Wehkamp J, Schmid M, Stange EF. Defensins and other antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol*, 2007, 23, 370-378.
- [3] Wilson CL, Ouellette AJ, Satchell DP, et al. Regulation of intestinal α -defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science*, 1999, 286, 113-117.
- [4] 王永胜,吕茂,王思花. 小肠潘氏细胞防御素. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2007, 28, 221-224.
- [5] 吴仲文. 肠道屏障与肠道微生态. 中国危重病急救医学, 2004, 16, 768-770.
- [6] 杨红明,柴家科,吴焱秋,等. 烫伤大鼠肠道防御素-5 和相关酶转录表达及细菌移位关系的探讨. 中国危重病急救医学, 2004, 16, 345-347.
- [7] Lehrer RI, Jung G, Ruchala P, et al. Human alpha-defensins inhibit hemolysis mediated by cholesterol-dependent cytolysins. *Infect Immun*, 2009, 77, 4028-

4040.

[8] Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*, 2002, 347, 417-429.

[9] Watts DA, Satsangi J. The genetic jigsaw of inflammatory bowel disease. *Gut*, 2002, 50 Suppl 3, I 31-36.

[10] Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2003, 124, 521-536.

[11] Wehkamp J, Schmid M, Fellermann K, et al. Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn's disease. *J Leukoc Biol*, 2005, 77, 460-465.

[12] Ogura Y, Lala S, Xin W, et al. Expression of NOD2 in Paneth cells, a possible link to Crohn's ileitis. *Gut*, 2003, 52, 1591-1597.

[13] Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut*, 2004, 53, 1658-1664.

[14] Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, et al. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102, 18129-18134.

[15] Elmes ME, Jones JG, Stanton MR. Changes in the Paneth cell population of human small intestine assessed by image analysis of the secretory granule area. *J Clin Pathol*, 1983, 36, 867-872.

[16] Fellermann K, Stange DE, Schaeffeler E, et al. A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am J Hum Genet*, 2006, 79, 439-448.

[17] Wehkamp J, Chu H, Shen B, et al. Paneth cell antimicrobial peptides, topographical distribution and quantification in human gastrointestinal tissues. *FEBS Lett*, 2006, 580, 5344-5350.

[18] Wehkamp J, Fellermann K, Herrlinger KR, et al. Mechanisms of disease, defensins in gastrointestinal disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 2005, 2, 406-415.

[19] Stronati L, Negroni A, Pierdomenico M, et al. Altered expression of innate immunity genes in different intestinal sites of children with ulcerative colitis. *Dig Liver Dis*, 2010, 42, 848-853.

[20] 邹开芳, 张细元. 防御素在溃疡性结肠炎结肠组织中的表达及意义. *中华消化杂志*, 2006, 28, 505-507.

[21] Kanmura S, Uto H, Numata M, et al. Human neutrophil peptides 1-3 are useful biomarkers in patients with active ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 2009, 15, 909-917.

[22] Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet*, 2007, 39, 207-211.

[23] Wehkamp J, Koslowski M, Wang G, et al. Barrier dysfunction due to distinct defensin deficiencies in small intestinal and colonic Crohn's disease. *Mucosal Immunol*, 2008, 1, S67-74.

[24] Hu C, Sun L, Hu Y, et al. Functional characterization of the NF-kappa B binding site in the human NOD2 promoter. *Cell Mol Immunol*, 2010, 7, 288-295.

[25] Simms LA, Doecke JD, Walsh MD, et al. Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut*, 2008, 57, 903-910.

[26] 郭陈智, 范华骅. Wnt 信号通路参与外周免疫调节的研究进展. *生命科学*, 2010, 22, 357-361.

[27] van Es JH, Jay P, Gregorieff A, et al. Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. *Nat Cell Biol*, 2005, 7, 381-386.

[28] Andreu P, Peignon G, Slomianny C, et al. A genetic study of the role of the Wnt/beta-catenin signalling in Paneth cell differentiation. *Dev Biol*, 2008, 324, 288-296.

[29] Koslowski MJ, Kübler I, Chamailard M, et al. Genetic variants of Wnt transcription factor TCF-4 (TCF7L2) putative promoter region are associated with small intestinal Crohn's disease. *PLoS One*, 2009, 4, e4496.

[30] Fowler EV, Doecke J, Simms LA, et al. ATG16L1 T300A shows strong associations with disease subgroups in a large Australian IBD population, further support for significant disease heterogeneity. *Am J Gastroenterol*, 2008, 103, 2519-2526.

[31] 智佳, 智发朝, 陈正彦, 等. 自噬体基因 ATG16L1 多态性与炎症性肠病的相关性研究. *南方医科大学学报*, 2008, 28, 649-651.

[32] Yamazaki K, Onouchi Y, Takazoe M, et al. Association analysis of genetic variants in IL23R, ATG16L1 and 5p13.1 loci with Crohn's disease in Japanese patients. *J Hum Genet*, 2007, 52, 575-583.

[33] Garabedian EM, Roberts LJ, McNevin MS, et al. Examining the role of Paneth cells in the small intestine by lineage ablation in transgenic mice. *J Biol Chem*, 1997, 272, 23729-23740.

[34] Sherman MP, Bennett SH, Hwang FF, et al. Paneth cells and antibacterial host defense in neonatal small intestine. *Infect Immun*, 2005, 73, 6143-6146.

[35] Schumann A, Nutten S, Donnicola D, et al. Neonatal antibiotic treatment alters gastrointestinal tract developmental gene expression and intestinal barrier transcriptome. *Physiol Genomics*, 2005, 23, 235-245.

[36] Preet S, Verma I, Rishi P. Cryptdin-2, a novel therapeutic agent for experimental Salmonella Typhimurium infection. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65, 991-994.

(收稿日期, 2011-02-17)

(本文编辑, 李银平)

• 科研新闻速递 •

丙泊酚对氧化应激作用增强的血管平滑肌细胞有促损伤作用

近日, 美国学者研究了丙泊酚对过氧化氢所致血管平滑肌细胞损伤的影响及分子机制。在细胞实验中, 收集经过氧化氢预处理的大鼠血管平滑肌细胞, 并加入一定浓度的丙泊酚, 然后检测细胞存活或死亡数量, 并通过检测天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase-3) 的表达情况了解细胞凋亡。结果证明, 丙泊酚可加重过氧化氢所致平滑肌损伤, 使存活细胞数减少、凋亡细胞增加, caspase-3 的表达也相应增加。由此研究人员认为, 丙泊酚可以通过增加细胞凋亡, 加重氧化应激作用增强的血管平滑肌细胞损伤。

刘先奇, 编译自《Crit Care Med》, 2011-01-21 (电子版); 胡森, 审核