

- phimurium by RamA in response to environmental signals[J]. J Bio Chem, 2008, 283(35): 24245.
- [13] David K, Alexey R. MarA-mediated overexpression of the AcrAB efflux pump results in decreased susceptibility to tigecycline in Escherichia coli[J]. J Antimicrobial Chemotherapy, 2008, 61: 46.
- [14] Taketo K, Kameino L, Fujisawa I. High hydrostatic pressure treatment impairs AcrAB-TolC pump resulting in differential loss of deoxycholate Tolerance in Escherichia coli[J]. J Bio Bioeng, 2005, 100: 6.
- [15] Paixão L, Rodrigues L, Couto I, et al. Fluorometric deter-

mination of ethidium bromide efflux kinetics in Escherichia coli[J]. J Biol Eng, 2009, 3: 18.

- [16] Mallea M, Chevalier J, Eyraud A, et al. Inhibitors of antibiotic efflux pump in resistant Enterobacter aerogenes strains[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 293(5): 1370.
- [17] 周安宇. 746 例痰标本中的病原菌分布及耐药性分析[J]. 重庆医学, 2008, 37(11): 1327.

(收稿日期: 2010-04-10 修回日期: 2010-05-28)

抗菌肽抗结核作用的研究进展

岳俊伊 综述, 张 健 审校

(重庆医科大学附属第一医院骨科 400016)

关键词: 抗菌肽; 防御素; 结核; 耐药

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-8348. 2010. 19. 058

中图分类号: R52. 05

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)19-2673-03

抗菌肽(antibacterial peptide)是生物体产生的一种阳离子多肽,广泛存在于从原虫到人类的各种生物体内^[1],对革兰阳性球菌、革兰阴性杆菌甚至某些真菌、原生动物都有杀灭作用,其对结核杆菌亦是有效的,且没有传统抗结核药的耐药性、严重不良反应等一系列弊端,有可能成为结核治疗的一个新途径。

作为一种生物抗菌药物,抗菌肽具有一系列优势:存在广泛、抗菌谱广、杀菌快速、无蓄积中毒作用、作用专一的特点,并且由于它与传统抗菌药物有不同的作用机制,从而使其成为对付耐药菌的一个重要候选对象。

研究证明内源性抗微生物多肽(PG-1)、人 α 、 β -防御素-1和PR-39等抗菌肽对结核杆菌是有效的^[2-4],并且没有结核化疗药物的肝功能损害、胃肠道症状、过敏反应^[5]等一系列不良反应,这激发了我们用抗菌肽对抗结核的兴趣。本文综述抗菌肽对结核分支杆菌的作用的进展情况。

1 直接对结核菌的作用

Miyakawa等^[6]报道在体外人、兔防御素和猪内源性抗微生物多肽对H37Rv结核分支杆菌菌株有效。同时对3个临床分离的结核菌株进行作用,发现结核菌的减少亦达到86.3%~99%。扫描电子显微镜发现防御素在结核分支杆菌表面有作用位点,通过此位点可导致H37Rv菌株表面损伤,证实抗菌肽是机体对结核防御机制的重要组成部分,提示结核治疗的一个新的途径。

Rivas等^[7]用免疫染色显示人肺泡上皮细胞系——A549细胞系在感染结核杆菌后细胞内抗菌肽——人 β 防御素-2(HBD-2)的存在且在结核菌集落附近染色更强烈,不仅证明A549细胞系内可产生HBD-2,而且提示HBD-2与胞内结核菌有相互作用。说明肺泡上皮细胞也可以通过产生HBD-2来对胞内结核发挥作用。低倍镜下HBD-2免疫染色提示HBD-2产物被胞内结核菌诱导。免疫电镜显示HBD-2标记到结核杆菌的胞浆和胞壁。且直接接触A549的胞外结核菌也显示HBD-2标记,提示不仅胞内结核菌,胞外结核菌也可以成为HBD-2的目标。并且HBD-2标记胞内断裂的结核菌可推测HBD-2参与杀死胞内结核菌。另外,HBD-2也有趋化因子样

作用,表现为对未成熟树突状细胞和记忆淋巴细胞的趋化作用,这可能激发获得性免疫,从而加强抗结核作用。

在人体内结核菌的真正宿主是巨噬细胞,但是巨噬细胞内缺少足够量的抗菌介质。尤其是在人巨噬细胞内不表达防御素^[8]。Rivas等^[7]证实通过逆转录PCR的方法发现结核分支杆菌H37Rv感染血单核细胞均不表达HBD-2基因。说明在生理条件下单核、巨噬细胞基本不表达HBD-2基因。而通过免疫细胞化学和电子显微镜亦未在单核、巨噬细胞内探测到HBD-2胞内产物。故让巨噬细胞表达抗菌肽成为一条抗结核的新途径并且已有很多成果。Kisich等^[9]证明HBD-2转染血单核细胞控制结核生长的效果比天然单核细胞好。故在治疗结核方面抗菌肽转染单核巨噬细胞可能是一个很有希望的途径。

2 抗菌肽对结核杆菌的作用靶点

Sharma等^[10]证明结核杆菌细胞壁、细胞膜是HNP-1(human neutrophil peptide)的主要作用靶点。因为生长在HNP-1环境中的结核菌显示出表面改变,电镜分析显示出明显的细胞壁、细胞膜改变。该学者还报道证明HNP-1浓度依赖性的对M. tuberculosis H37Rv生长的抑制。用HNP-1处理胞外生长的和被吞噬的结核杆菌都广泛地抑制大分子生物合成,尤其是DNA和类脂。这提示抗菌肽的作用靶点除结核菌细胞膜外还可能包括DNA在内的胞内成分^[11]。

用放射性标记的HNP-1作用于结核杆菌后最大的放射活性在胞膜(43.5%),其次在胞壁(21.34%),但是仍有12%在胞浆内。这些结果进一步证明细胞膜、细胞质是防御素主要作用靶点,DNA可能是第2位的胞内作用靶点^[11]。

3 抗菌肽与抗结核药物的协同作用

多个实验证实,PG-1在体外抑制结核并且显示异烟肼的活性可以被PG-1和HBD-1激活^[12]。表达于猪的中性粒细胞的protegrins(PG)杀菌的机制不完全清楚,但其破坏细胞膜的能力被认为是至关重要的。PG-1在细胞膜上形成阳离子选择通道,异烟肼是亲水小分子,可以通过被动扩散进入结核菌。因此,二者联合的作用可能是PG-1使细胞膜的变化促进异烟肼(INH)进入细胞。该研究显示尽管抗菌肽自身在生理浓度

可能无效,但他们的存在可以使某些药物更有效^[12]。

此种协同效应在 HNP-1 亦早已有报道。HNP-1 不仅有强大的杀结核菌效应,亦可增加分支杆菌外膜渗透性,从而促进药物进入分支杆菌细胞内^[10]。而抗结核药耐药的主要原因被认为是结核分支杆菌特有的阻止药物进入的细胞外膜屏障。分支杆菌富含脂质的细胞壁使细胞表面疏水,导致细胞聚集和减少对各种分子的通透性,其中就包括了抗结核药^[13]。抗菌肽与各种抗菌药物联合应用对各种病原菌显示出协同活性。HBD-1 对耐药的和药物敏感的结核菌两种菌株活性均低^[12]。然而,分别联合异烟肼可以较单用抗菌肽或单用异烟肼明显减少结核菌的生长。实验显示,每周每只老鼠给予 2 mg HNP-1 和低浓度抗结核药,比单用药物显著减少结核菌的负载。这个组合比得上单用高剂量抗结核药,同时避免了高剂量抗结核药的不良反应。这些发现证实了二者的协同效应^[13]。

联合应用 HNP-1、异烟肼、利福平对抗 H37Rv 在体外和体内,以最低抑菌浓度为指标,观察到了明显的协同作用: MICs 体外最低抑菌浓度可降至 1/16,杀胞内结核菌只要最低抑菌浓度的 1/8 在体内,与对照动物相比,HNP-1 联合抗结核药显著减少感染的肺、肝、脾内的结核菌负载。治疗计划里辅以 HNP-1 药物有效治疗剂量可以减少 50%。这些结果提示 HNP-1 至少可以作为结核常规化疗的辅助物^[13]。

4 对巨噬细胞胞内结核菌的作用

结核杆菌生长在不能产生成熟溶酶体的吞噬细胞内。结核杆菌可以在巨噬细胞内快速增殖,即使巨噬细胞被细胞因子激活也是如此。然而,世界上 1/3 的人感染结核却不发病,说明可能有其他因素辅助巨噬细胞限制结核杆菌增殖,其中一个重要因素是防御素之类的抗菌肽。

实验发现用不同浓度的 HNP-1 处理 3 d 后有 50%~98% 胞内结核菌被杀死^[14],说明抗菌肽对胞内结核菌是有效果的。但是,人巨噬细胞本身不表达 α 或 β 防御素等抗菌肽,故需外源性引入。防御素其化学合成却仍是个挑战,难以大规模生产并且重组体的方法不产生足够的产量。故出现很多分子生物学的方法使巨噬细胞自身表达抗菌肽的尝试。Simeos 等^[15]报道人类巨噬细胞转染 DNA 质粒的研究很少,转染目的基因的效率只有 2%。说明人类巨噬细胞很难转染质粒。但初级巨噬细胞允许 mRNA 转染。可以通过高效信使 RNA 转染人巨噬细胞从而合成人抗菌肽。mRNA 阳离子脂质复合物转染巨噬细胞的转染效率比转染质粒好得多——达到 90% 的阳性率,质粒只有 2%^[9]。

Kisich 等^[9]发现 mRNA 阳离子脂质复合物转染后,HBD-2 影响巨噬细胞内结核菌的生长,部分依赖防御素蛋白获得结核杆菌的通道。用免疫组化的方法证实 HBD-2 可以由转染 HBD-2 mRNA 的巨噬细胞产生,并且确定 HBD-2 在巨噬细胞中的定位,显示其连到胞内结核菌上。该研究证明,培养的人初级巨噬细胞能够有效转染编码有治疗作用蛋白质的 mRNA,从而增加抗微生物活性。而 DNA 阳离子脂质复合物有同样的效率,但 HBD-2 表达明显减少,这提示摄入核苷酸不是表达的限制步骤。可能是因为 DNA 到细胞核的转运或启动子的活性是限速步骤。但是不能显示 HBD-2 到达结核杆菌的具体通道,而在上皮细胞 HBD-2 被正常合成,直接通过高尔基体分泌,且不储存在细胞内。阐明 HBD-2 到达巨噬细胞内结核菌的途径仍需进一步的研究。HBD-2 对胞内结核菌的抑制效应是强有力的,并且持续至少 7 d。巨噬细胞用 HBD-2 mRNA 处理后,头 24 h 内有活力的结核杆菌下降 50%。

5 巨噬细胞与中性粒细胞的协同抗结核作用

巨噬细胞是结核杆菌的宿主,至今在人的巨噬细胞内没有

发现防御素^[4],另一方面人中性粒细胞包含多种抗菌肽,包括防御素。巨噬细胞可以通过胞吞多形核粒细胞的材料来杀结核杆菌。中性粒细胞有巨大抗菌活性,定居在其空泡内有 4 种亚型的中性颗粒,每一型有一种或多种特有蛋白。其中两种亚型是抗微生物物质的储存库:一种是嗜苯胺蓝的颗粒包含防御素等,还有一种特殊颗粒。而巨噬细胞实质上缺少有大量抗菌介质的成型颗粒。中性粒细胞在宿主对结核的防御反应中的作用已被证实,清除中性粒细胞后再用结核杆菌激发免疫,可以降低对结核杆菌感染的免疫反应^[16]。巨噬细胞吞噬凋亡中性粒细胞的颗粒,中性粒细胞提供抗菌活性给感染结核菌的巨噬细胞。阐述了感染的巨噬细胞获得中性粒细胞内容物来抗结核菌的机制^[6]。

6 分支杆菌对抗菌肽的耐药性

传统抗结核药主要通过干扰结核菌 DNA 合成或酶的活性来实现其药理作用,但前提是这些药物能够进入细胞内,而结核菌耐药主要是因为其阻碍药物进入的细胞外膜。抗菌肽有与其完全不同的机制:主要通过直接破坏细胞膜的完整性来杀死结核菌,故分支杆菌对抗微生物肽(AMPs)的耐药性比常规抗结核药要小得多。

7 抗菌肽的趋化作用

防御素有直接杀菌作用和对免疫细胞的趋化作用,可以动员树突状细胞、肥大细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、T 淋巴细胞、补体等^[17],从而加强局部的免疫反应,并且把原发免疫反应和继发免疫反应联系起来。

8 体内抗结核杆菌的作用

Fu^[18]报道在体内早期损伤处的中性粒细胞释放 HNP 从而吸引单核细胞聚集。巨噬细胞再摄取中性粒细胞释放的颗粒来杀死胞内的结核菌。

有报道显示 Crohn's 病可能与 α -防御素、HD5、HD6 等的缺陷有关^[19]。推测如果抗菌肽表达缺陷的人对结核的抵抗力是否低一些呢?这方面尚无进一步的报道。

Li 等^[20]报道:一种人工合成的抗菌肽 KLKL5KLLK 与结核菌 DNA 疫苗合用可以增加结核菌 DNA 疫苗的效应,延长免疫反应的时间。

在哺乳动物气道提取的 β 防御素其浓度在体外可以杀菌,提示其在体内也有此功能^[9]。杀结核菌的机制与结核杆菌对中性粒细胞防御素的暴露增加相关。

由于尚无抗菌肽临床应用的报道,抗菌肽治疗结核是否需要传统抗结核药这样至少长达 6 个月的疗程以及其长期使用的不良反应尚不明确。

总之,耐药结核菌株的出现已使结核的防治形势日益严峻,传统抗结核药都不同程度地出现了相应的耐药菌株,亟需新的抗结核药来遏制结核的死灰复燃。抗菌肽可以协助传统抗结核药的作用,大大减少抗结核药的用量,从而减轻其不良反应,抗菌肽作为传统抗结核药的一个辅助药物的效果是显著的。

抗菌肽自身的抗结核效果也是明确的,并且作用机制与以前的抗结核药有本质的区别,故抗菌肽有潜力可以成为传统抗结核药的一个替代药物,其开发前景是不可估量的。但是,抗菌肽的化学合成还是个难题,难以大规模生产似乎是其大规模应用的瓶颈,有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 廖伟,钱桂生. 人 β 防御素-2 研究进展[J]. 重庆医学, 2005,34(2):135.
- [2] Linde CM, Hoffner SE, Refai E, et al. In vitro activity of

- PR-39, a proline-arginine-rich peptide, against susceptible and multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 47:575.
- [3] Sharma S, Verma I, Khuller GK. Therapeutic potential of human neutrophil peptide 1 against experimental tuberculosis[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45:639.
- [4] Rivas SB, Contreras JC, Sada E, et al. The potential role of lung epithelial cells and beta-defensins in experimental latent tuberculosis[J]. *Scand J Immunol*, 2008, 67:448.
- [5] 卢奇志, 张洪平. 利福霉素过敏致多器官损害 4 例[J]. *重庆医学*, 2004, 33(2):190.
- [6] Miyakawa Y, Ratnakar P, Rao AG, et al. In vitro activity of the antimicrobial peptides human and rabbit defensins and porcine leukocyte protegrin against *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Infect Immun*, 1996, 64:926.
- [7] Rivas SB, Schwander SK, Sarabia C, et al. Human β -defensin 2 is expressed and associated with *Mycobacterium tuberculosis* during infection of human alveolar epithelial cells[J]. *Infect Immun*, 2005, 73:4505.
- [8] Tan BH, Meinken C, Bastian M, et al. Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens[J]. *J Immunol*, 2006, 177:1864.
- [9] Kisich KO, Heifets L, Higgins M, et al. Antimycobacterial agent based on mRNA encoding human beta-defensin 2 enables primary macrophages to restrict growth of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Infect Immun*, 2001, 69:2692.
- [10] Sharma S, Verma I, Khuller GK. Biochemical interaction of human neutrophil peptide-1 with *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv[J]. *Arch Microbiol*, 1999, 171:338.
- [11] Sharma S, Khuller G. DNA as the intracellular secondary target for antibacterial action of human neutrophil peptide-I against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv [J]. *Curr Microbiol*, 2001, 43:74.
- [12] Fattorini L, Gennaro R, Zanetti M, et al. In vitro activity of protegrin-1 and beta-defensin-1, alone and in combination with isoniazid, against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Peptides*, 2004, 25:1075.
- [13] Kalita A, Verma I, Khuller GK. Role of human neutrophil peptide-1 as a possible adjunct to antituberculosis chemotherapy[J]. *J Infect Dis*, 2004, 190:1476.
- [14] Sharma S, Verma I, Khuller GK. Antibacterial activity of human neutrophil peptide-1 against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv; in vitro and ex vivo study[J]. *Eur Respir J*, 2000, 16:112.
- [15] Simoes S, Slepshkin V, Pretzer E, et al. Transfection of human macrophages by lipoplexes via the combined use of transferrin and pH-sensitive peptides[J]. *J Leukoc Biol*, 1999, 65:270.
- [16] Seiler P, Aichele P, Bandermann S, et al. Early granuloma formation after aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection is regulated by neutrophils via CXCR3-signaling chemokines[J]. *Eur J Immunol*, 2003, 33:2676.
- [17] Soruri A, Grigat J, Forssmann U, et al. Beta-Defensins chemoattract macrophages and mast cells but not lymphocytes and dendritic cells; CCR6 is not involved[J]. *Eur J Immunol*, 2007, 37:2474.
- [18] Fu LM. The potential of human neutrophil peptides in tuberculosis therapy[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2003, 7:1027.
- [19] Gersemann M, Wehkamp J, Fellermann K, et al. Crohn's disease—defect in innate defence[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14:5499.
- [20] Li M, Yu DH, Cai H. The synthetic antimicrobial peptide KLKL5KLK enhances the protection and efficacy of the combined DNA vaccine against *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *DNA Cell Biol*, 2008, 27:405.

(收稿日期:2010-03-18 修回日期:2010-05-14)

• 综 述 •

缺氧诱导因子-1 功能调节及其在凋亡中的研究进展

刘兴振 综述, 沈康平 审校

(上海交通大学医学院附属第三人民医院骨科, 上海 201900)

关键词: 缺氧诱导因子-1; 功能调节; 凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.19.059

中图分类号: R364.4

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)19-2675-03

缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)是一个普遍存在于人和哺乳动物细胞内的缺氧应答因子,是细胞在缺氧环境下重要的转录因子^[1]。HIF-1 是缺氧诱导基因转录的关键环节,而且是缺氧诱导基因转录过程中缺氧信息传递的共同通路^[2]。HIF-1 的发现使人们对缺血、缺氧状态下机体各种应答反应机制的研究更加深入。目前已发现 HIF-1 可调控一系列靶基因的表达,具有许多重要的生物学效应。本文主要就 HIF-1 在结构、功能调节及其在凋亡中的生物学功能研究进展综述如下。

1 HIF-1 的结构

HIF-1 属于 DNA 结合蛋白,主要以异源二聚体的形式存

在,由相对分子质量为 120 kd 的 HIF-1 α 和相对分子质量为 91、93、94 kd(3 种相对分子量)的 HIF-1 β 或称芳香烃受体核转位蛋白(aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT)2 个亚基组成。2 个亚基均属于真核细胞转录 BHLH-PAS (Basic-Helix-Loop-Helix-Per/RNT/Ahr/Sim)家族蛋白成员,在 2 个亚基的 N 末端均含有 BHLH 结构域与 PAS 结构域,共同参与聚化作用和介导 DNA 结合功能^[3-4]。

人的 HIF-1 α 基因定位于 14q21~24 染色体, cDNA 全长 3.7 Kb, 含 15 个外显子、14 个内显子。不同的外显子编码不同的功能结构域,其开放阅读框 2 478 bp, 编码 826 个氨基酸。HIF-1 α 为 HIF-1 所特有, O₂ 浓度变化对 HIF-1 活性调节主要