

· 基础研究 ·

HBD3 基因真核表达质粒载体的构建及其体外表达和活性鉴定*

夏章权^{1,2}, 张从纪^{1△}, 王涛³

(1. 第三军医大学西南医院口腔科, 重庆 400038; 2. 解放军第二九一医院口腔科, 内蒙古包头 014040;
3. 第三军医大学全军复合伤研究所, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400038)

摘要:目的 构建人 β 防御素 3(HBD3) 基因真核表达质粒载体, 观察其在大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)中的表达, 并检测其活性。方法 利用 RT-PCR 方法从牙龈组织中扩增出 HBD3 基因片段, 通过 DNA 重组技术将基因片段重组于 pVIVO1-mcs 真核表达质粒载体上, 构建成 pVIVO1-HBD3 重组质粒载体, 分别用酶切电泳分析及 DNA 测序的方法对重组质粒载体进行鉴定。运用 jetPEI 转染试剂将重组质粒转染 BMSCs 后, RT-PCR、免疫荧光和蛋白质印迹法检测目的基因的表达。取转染重组质粒的 BMSCs 无血清上清的浓缩液, 采用 K-B 纸片扩散法进行抗菌活性实验。结果 (1) 酶切电泳分析得到相应的目的片段, 大小与理论计算值一致, DNA 测序证实目的基因序列正确无突变, 成功构建真核表达质粒载体 pVIVO1-HBD3。(2) RT-PCR 和免疫荧光、蛋白质印迹法分别从 mRNA 和蛋白质 2 个水平证实转染的 BMSCs 高表达 HBD3。(3) 转染重组质粒的 BMSCs 无血清上清的浓缩液对白色念珠菌、大肠埃希菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌产生明显的抑菌环, 证实了表达分泌出的 HBD3 的抗菌活性。结论 构建了 pVIVO1-HBD3 基因真核表达质粒载体, 证实其转染 BMSCs 后基因的表达和活性。

关键词: β 防御素; 基因表达; 间质干细胞; 抗菌活性

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.01.020

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)01-0051-03

Construction and in expression of eukaryotic expression plasmid containing HBD3 gene*

Xia Zhangquan^{1,2}, Zhang Congji^{1△}, Wang Tao³

(1. Department of Stomatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;
2. Department of Stomatology, the 291th Hospital of Chinese People's Liberation Army,
Baotou, Inner Mongolia 014040, China; 3. Institute of Combined Injury, State Key Laboratory of Trauma,
Burns and Combined Injury, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To further determine the possible effect on antimicrobial activity, plasmid vector containing recombinant human beta defensins 3(HBD3) gene was constructed and the expression of exogenous gene in transformed bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) was observed. **Methods** By using RT-PCR obtained HBD3 from gingiva tissue, then recombined the gene to plasmid pVIVO1-mcs. The recombined plasmid vector was named as pVIVO1-HBD3 and identified by restriction enzyme analysis and DNA sequencin. After the recombined plasmid transformed BMSCs, expression of HBD3 in BMSCs was detected by RT-PCR, immunofluorescence and Western blot, and the function was determined by Kleihauer-Betke (K-B) test. **Results** We successfully constructed recombinant plasmid vector that expressed HBD3. The expression of HBD3 were confirmed by RT-PCR, immunofluorescence and Western blot on transformed BMSCs. The function of HBD3 were confirmed by K-B test. **Conclusion** The established BMSCs that overexpressed HBD3 provide a new strategy of gene therapy to promote wound healing, especially the infected one.

Key words: beta-defensins; gene expression; mesenchymal stem cells; antimicrobial activity

头颈部放疗所致的口腔黏膜炎及糖尿病患者的口腔黏膜损伤等慢性难愈创伤往往合并感染, 使得其在治疗上更加复杂和困难。口腔是个有菌的环境, 存在细菌、真菌和病毒等, 伤口感染在所难免, 促进伤口愈合的同时还必须防治创面感染。人 β 防御素 3 (human beta defensins 3, HBD3) 作为天然抗微生物肽, 有明显的杀菌和抑菌作用, 并有抗真菌、病毒和中和毒素的作用^[1]。骨髓间充质干细胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs) 在用于治疗久治不愈的软组织创伤方面显现出巨大潜能^[2]。本研究拟构建 HBD3 基因真核表达质粒载体, 体外转染 BMSCs, 以期在局部用于慢性创面时, 能大量合成释放 HBD3, 发挥抗感染的作用, 促进创面愈合。

1 材料与与方法

1.1 材料与试剂 手术中切除的患者牙龈组织由西南医院口

腔科提供, 白色念珠菌 CA(ATCC 10231, 真菌)、大肠埃希菌 EC(ATCC 25922)、绿脓杆菌 PA(ATCC 27853)、金黄色葡萄球菌 SA(ATCC 25923) 和枯草芽孢杆菌 BS(ATCC 62037) 由全军复合伤研究所王涛博士保存, HBD3 上下游引物由上海捷瑞生物公司合成, 质粒 pVIVO1-mcs 购自 InvivoGen 公司, 转染试剂 jetPEI 购自 Polyplus-transfection 公司, 总 RNA 提取试剂盒、T₄ DNA 连接酶、TaqDNA 聚合酶购自大连宝生物公司, 质粒小提试剂盒、普通 DNA 产物纯化试剂盒、RNA prep Pure 培养细胞总 RNA 提取试剂盒购自北京天根试剂公司, 内切酶 NcoI、EcoRI、逆转录试剂盒 (ReverTra Ace- α)、高保真聚合酶 (KOD-Plus) 购自日本东洋纺试剂公司, HBD3 一抗 β -defensin3(K-13) 购自 SANTA 公司, HBD3 荧光二抗、HBD3 二抗、BCA 法定量蛋白试剂盒、ECL 发光试剂盒购自碧云天试剂公

司,蛋白浓缩试剂盒购自北京普利莱试剂公司。

1.2 真核表达质粒载体 pVIVO1-HBD3 的构建

1.2.1 HBD3 的引物设计

HBD3 为分泌性表达的功能蛋白分子,根据该分子加工表达的特点,在引物设计上作者针对性地对它们包含信号肽序列的编码区进行了扩增(加下划线的为酶切位点,P1 设计中引入了 Nco I 酶切位点,P2 设计中引入了 EcoR I 酶切位点)。

上游引物 P1:5'-CAT GCC ATG GCA GCT ATG AGG ATC CAT-3',

下游引物 P2:5'-CCG GAA TTC TCA GGG TTT TTA TTT CT-3'。

1.2.2 真核表达质粒载体 pVIVO1-HBD3 的构建

按照总 RNA 提取试剂盒的操作步骤提取牙龈组织中的总 RNA。按逆转录试剂盒(ReverTra Ace- α)和高保真聚合酶(KOD-Plus)的操作步骤进行 RT-PCR。退火温度为 48.2 °C,循环数为 35。从牙龈组织中扩增出 HBD3 基因片段。HBD3 PCR 产物按照普通 DNA 产物纯化试剂盒的操作步骤进行纯化,HBD3 纯化产物和质粒 pVIVO1-mcs 经 Nco I、EcoR I 双酶切后再次纯化,连接过夜,连接产物转化 E. coli DH5 α 感受态细菌,接种于含有潮霉素的 LB 平板 37 °C 孵育 16 h。挑选多个单菌落扩大培养,PCR 初步筛选阳性克隆,Nco I、EcoR I 双酶切鉴定后送测序进一步证实^[3-4]。

1.3 SD 大鼠 BMSCs 的分离与培养

按照标准方法分离和培养 SD 大鼠 BMSCs^[5],取状态良好的第 3 代 BMSCs 用作转染。

1.4 重组质粒转染 BMSCs 后 HBD3 的表达和活性鉴定

1.4.1 重组质粒转染 BMSCs

于转染前 1 d 将 BMSCs 按 3×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,当细胞长满至 50%~70%时,分别以 pVIVO1-mcs、pVIVO1-HBD3 转染 BMSCs,具体操作按转染试剂 jetPEI 试剂盒的说明书进行,同时设置未转染的 BMSCs 对照,将转染的细胞置于 37 °C、5%的 CO₂ 孵箱培养 48 h^[6]。

1.4.2 RT-PCR 方法检测重组质粒转染 BMSCs 后的表达

转染 48 h 时,弃上清收集细胞,按 RNA prep Pure 培养细胞总 RNA 提取试剂盒的操作步骤提取上述 3 组细胞中的总 RNA,按逆转录试剂盒(ReverTra Ace- α)和 TaqDNA 聚合酶的操作步骤进行 RT-PCR。循环数改为 25,反应体系。反应条件和引物同前,PCR 的同时再分别以各自的总 RNA 为模板作为阴性对照。

1.4.3 免疫荧光检测重组质粒转染 BMSCs 后的表达

将 BMSCs 常规传代到 24 孔板中,至 50%左右融合时转染质粒载体,转染 48 h 时,弃培养液,磷酸二氢盐缓冲液(PBS)漂洗,4%多聚甲醛 37 °C 固定,室温下以含 0.1%NP₁₀的 PBS 振洗,吸去多余液体,山羊抗人一抗(1:200)37 °C 孵育 2 h,PBS 振洗,Cy3 标记驴抗山羊荧光二抗(1:500)37 °C 孵育 1 h,PBS 振洗,加 50 mL DAPI 室温放置片刻,甲醇漂洗后,PBS 漂洗。荧光显微镜下观察采集图像。阳性部分为明亮的鲜红色荧光。

1.4.4 蛋白质印迹检测重组质粒转染 BMSCs 后的表达

转染 48 h 时,分别收集 3 组培养细胞的上清和细胞。用 RIPA 法提取细胞中总蛋白,按蛋白浓缩试剂盒的说明对细胞上清蛋白进行浓缩,BCA 法定量蛋白,变性后行 12%SDS-PAGE 电泳,半干法转膜,条件为 15 V 恒压,30 min。山羊抗人 HBD3 一抗(1:100),HRP 标记驴抗山羊 IgG 先后杂交反应后 ECL 发光试剂盒显色,在 Gel Doc2000 凝胶成像系统上分析处理,扫描图像^[7]。

1.4.5 K-B 纸片扩散法进行抗菌活性实验

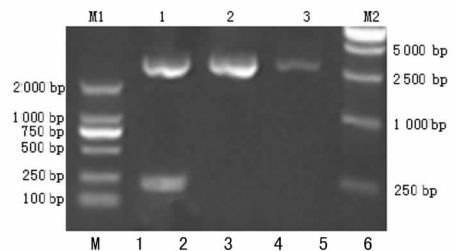
转染 12 h 时,更

换无血清的上清继续培养 36 h,收集上述 3 组培养细胞的无血清上清,冷冻干燥后重溶,获取 20 倍浓缩液。自制消毒滤纸片浸泡于 3 种浓缩液中。将白色念珠菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌和枯草芽孢杆菌菌液解冻后分别取 5 μ L,“之”字划线于沙保氏/LB 平板,30/37 °C 孵育过夜。次日,挑取单个菌落于沙保氏/LB 液体培养基,30/37 °C,900 r/min 摇菌至光密度值为 0.6。各取菌液 30 μ L 加入 400 μ L 的沙保氏/LB 液体培养基中,混匀后均匀涂于沙保氏/LB 平板,待菌液晾干后,放置上述准备好的含药纸片,各纸片中心相距 2 cm,防止抑菌环融合。将平板放置 30/37 °C 孵箱,培养 10~12 h,观察抑菌环大小,并照相记录^[7]。

2 结果

2.1 成功构建重组质粒 pVIVO1-HBD3

作者成功地从牙龈组织中扩增出 HBD3 的编码区序列,其目的条带与 HBD3 PCR 产物的理论计算值 204 bp 一致。重组质粒经 Nco I、EcoR I 双酶切后得到 HBD3 基因片段,与预期的目的片段大小相符,证实质粒 pVIVO1-HBD3 重组成功(图 1)。测序结果进一步证实质粒 pVIVO1-HBD3 中 HBD3 与 GenBank 的序列(登录号 NM_018661.3 和 NM_001081551.2)一致,序列正确无突变,表明质粒 pVIVO1-HBD3 重组成功。



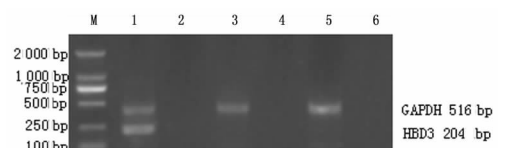
M₁、M₂:marker;1:Nco₂ 和 EcoRI 双酶切;2:空载体;3:重组质粒。

图 1 重组质粒 pVIVO1-HBD3 双酶切鉴定

2.2 重组质粒转染 BMSCs 后目的基因表达和活性鉴定

2.2.1 RT-PCR 方法检测重组质粒转染 BMSCs 后的表达

为了避免瞬时转染的质粒 DNA 污染造成的假阳性结果,在总 RNA 提取环节作者采用了能有效去除 DNA 污染的 RNA prep Pure 试剂盒;在 PCR 的环节,以相应的 RNA 作为模板来作对照以保证 RNA 质量。结果表明,未转染和转染空载体的细胞没有出现 204 bp 左右的 HBD3 条带,而转染重组质粒的细胞中,可以明显观察到 204 bp 左右的 HBD3 条带,说明转染重组质粒细胞能够有效转录表达 HBD3;3 组细胞中内参 GAPDH 表达一致;以提取的 3 组细胞中总 RNA 为模板,做 HBD3、GAPDH 的 PCR,未见目的条带,说明所提取的 3 组细胞中的总 RNA 不含有 DNA 污染(图 2)。



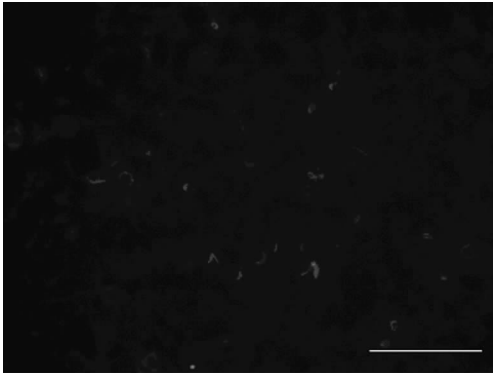
M:Marker;1、2:转染重组质粒组,1 以其 DNA 为模板,2 以其 RNA 为模板;3、4:转染空载体组,3 以其 DNA 为模板,4 以其 RNA 为模板;5、6:未转染组,5 以其 DNA 为模板,6 以其 RNA 为模板。

图 2 RT-PCR 方法检测重组质粒转染 BMSCs 后的表达

2.2.2 免疫荧光、蛋白质印迹法检测重组质粒转染 BMSCs 后的表达

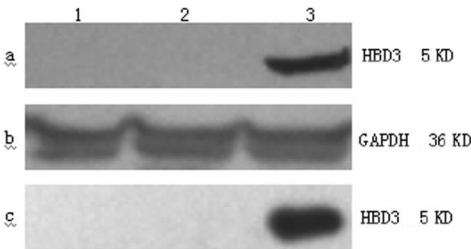
作者通过 RT-PCR 检测到 pVIVO1-HBD3 转染 BMSCs 后 HBD3 能够有效转录表达,继而通过免疫荧光、蛋白质印迹对其蛋白在细胞和培养上清中的表达进行了检测。免疫

荧光结果表明,未转染组和转染空载体组均未见荧光,转染重组质粒组可见明亮的鲜红色荧光,主要表达于细胞质(图 3)。蛋白质印迹结果显示,内参 GAPDH 在各组细胞之间表达量均一致,说明各组之间具有可比性;未转染组和空载体转染组中不表达 HBD3,而 HBD3 在转染了重组质粒的细胞和细胞上清中表达,说明转染重组质粒后,HBD3 蛋白能被表达且分泌到细胞质中(图 4)。



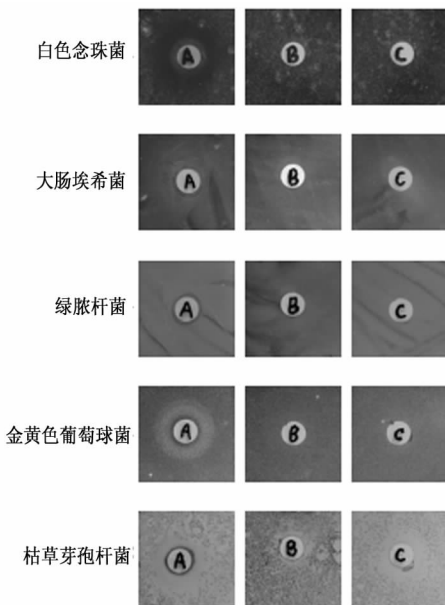
阳性部分为明亮的鲜红色荧光。

图 3 重组质粒转染 BMSCs 后表达 HBD3 蛋白(免疫荧光,×200)



1:未转染组;2:转染空载体组;3:转染重组质粒组;a、b、3 组细胞中蛋白;c:3 组细胞上清中蛋白。

图 4 蛋白质印迹法检测目的蛋白表达



A:转染重组质粒组;B:转染空载体组;C:未转染组。

图 5 K-B 纸片扩散法检测 3 种不同培养上清浓缩液的抑菌试验结果

2.2.3 K-B 纸片扩散法检测转染重组质粒的 BMSCs 无血清上清浓缩液的抗菌活性 HBD3 作为人体重要的内源性抗生素对真菌和 G⁻、G⁺ 细菌有抗菌活性,所以,挑选了一种常见的口腔致病真菌(CA),2 种 G⁻ 细菌(EC、PA)和 2 种 G⁺ 细菌(SA、BS)作为试验菌。抗菌活性实验结果显示,转染重组质粒的 BMSCs 无血清上清经 20 倍浓缩后,对白色念珠菌 CA、大肠埃希菌 EC、金黄色葡萄球菌 SA、绿脓杆菌 PA 和枯草芽孢杆菌 BS 产生明显的抑菌环(图 5)。证实 pVIVO1-HBD3 转染 BMSCs 后分泌至上清的 HBD3 具有生物学活性,能够抑制真菌、细菌生长,尤其是它能抑制真菌,更能显示出它的功能强大和优越性。

3 讨 论

机体损伤后出现协调的愈合过程,其中包括多种细胞、细胞因子和细胞外基质之间错综复杂的网络作用。BMSCs 促进伤口愈合的功能性特征包括:能够移行到创伤或炎症的部位,参与受损组织的再生与重建,刺激固有的祖细胞增殖和向不同方向分化,通过分泌生长因子和重新塑造细胞来促进受损细胞的恢复,发挥特殊的免疫调节和抗炎作用^[2,8]。因为对 BMSCs 的生物学特性有了更多的了解,所以,临床试验也把 BMSCs 作为一种修复细胞和(或)外源基因载体来促进创伤愈合^[2,8-9]。

局部微生物的持续感染也是创面慢性难愈或不愈的原因之一。有证据表明,无论何种类型的微生物,当每克组织中大于或等于 10⁶ 时,就和愈合受损密切相关^[10]。防御素有明显的杀菌和抑菌作用,并有抗真菌和中和毒素的作用,其效果与防御素量呈正相关^[11-12]。由于其独特的作用机制,几乎无耐药性,其中 HBD3 在人类预防和治疗感染性疾病方面发挥了重要作用,其在很小剂量范围内就表现出对革兰阳性菌的抗菌活性,同时其抗菌活性是非盐离子浓度敏感性的,也不引起溶血,相对分子质量小、合成快、弥散快,不影响口腔内环境微生物菌群,不伤害人体组织细胞,是理想的抗口腔内感染的活性抗菌肽。研究显示 HBD3 有特殊的生物学功能,如:化学诱导,因此,能够连接先天性免疫和获得性免疫^[13]。HBD3 的重组体和化学合成的 HBD3 的抗菌性和生物学特性与分离出来的天然肽没有区别^[14]。除了抗菌活性,HBD3 还有免疫调节的特性,如:对 T 淋巴细胞和未成熟的树突细胞的化学诱导,所以,在获得性免疫中扮演一个重要的角色。

本实验选用了 pVIVO1-mcs 真核表达质粒载体,其优点:和染色体不发生整合;该载体是瞬时表达,更适合用于创面基因治疗;没有细胞毒性效应产物产生。因此,作者构建了 HBD3 基因真核表达质粒载体,以期 HBD3 发挥抗菌活性,体外试验更进一步证实了该载体能够有效表达 HBD3,且分泌出的 HBD3 的蛋白具有抗菌活性。

本实验选择特异性能抗细菌、抗真菌并能中和毒素的 HBD3 作为活性生物分子,根据质粒载体构建流程,通过常规的分子生物学技术成功地构建了 pVIVO1-HBD3 重组质粒载体,用 RT-PCR、免疫荧光和蛋白质印迹法检测到重组质粒转染 BMSCs 后的目的基因表达,K-B 纸片扩散法证实了重组质粒转染 BMSCs 后表达 HBD3 的功能,具有抗菌活性,为后续进一步移植转染了重组质粒的 BMSCs、体内表达分泌 HBD3 防御感染以促进组织损伤恢复奠定了实验基础,同时由于 HBD3 显示出较强的抗真菌的活性,为其治疗口腔内真菌感染带来十分广阔的应用前景。

参考文献:

[1] Dhople V, Krukemeyer A, Ramamoorthy(下转第 57 页)

- [7] Nakamae H, Storer BE, Storb R, et al. Low-dose total body irradiation and fludarabine conditioning for HLA class I-mismatched donor stem cell transplantation and immunologic recovery in patients with hematologic malignancies: a multicenter trial[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2010, 16(3):384-386.
- [8] Thomson AW, Knolle PA. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment[J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(11):753-766.
- [9] Maroof A, Beattie L, Kirby A, et al. Dendritic cells matured by inflammation induce CD86-dependent priming of naive CD8+ T cells in the absence of their cognate peptide antigen[J]. *J Immunol*, 2009, 183(11):1295-1297.
- [10] Ramgolam VS, Degregorio SD, Rao GK, et al. T cell LFA-1 engagement induces HuR-dependent cytokine mRNA stabilization through a Vav-1, Rac1/2, p38 MAPK and MKK3 signaling cascade[J]. *PLoS One*, 2010, 5(12):1445-1447.
- [11] Eisenring M, vom Berg J, Kristiansen G, et al. IL-12 initiates tumor rejection via lymphoid tissue-inducer cells bearing the natural cytotoxicity receptor NKp46[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(11):1030-1038.
- [12] Antelo DP, Filgueira AL, Cunha JM. Reduction of skin-homing cytotoxic T cells (CD8+ CLA+) in patients with vitiligo [J]. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2011, 27(1):40-42.
- [13] Duong CP, Westwood JA, Berry LJ, et al. Enhancing the

specificity of T-cell cultures for adoptive immunotherapy of cancer[J]. *Immunotherapy*, 2011, 3(1):33-48.

- [14] Miller MR, Seifert J, Szabo NJ, et al. Erythrocyte membrane fatty acid content in infants consuming formulas supplemented with docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (ARA): an observational study[J]. *Matern Child Nutr*, 2010, 6(4):338-340.
- [15] Woodworth HL, McCaskey SJ, Duriancik DM, et al. Dietary fish oil alters T lymphocyte cell populations and exacerbates disease in a mouse model of inflammatory colitis [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(20):7960-7963.
- [16] Rockett BD, Salameh M, Carraway K, et al. ω -3 PUFA improves fatty acid composition, prevents palmitate-induced apoptosis, and differentially modifies B cell cytokine secretion in vitro and ex vivo[J]. *J Lipid Res*, 2010, 51(6):1284-1286.
- [17] Yessoufou A, Plé A, Moutairou K, et al. Docosahexaenoic acid reduces suppressive and migratory functions of CD4+ CD25+ regulatory T-cells[J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(12):2377-2379.
- [18] Hodge G, Hodge S, Li-Liew C, et al. Lymphocytic bronchiolitis is associated with inadequate suppression of blood T-cell granzyme B, IFN-gamma, and TNF-alpha [J]. *Transplantation*, 2010, 89(10):1283-1285.

(收稿日期:2011-06-08 修回日期:2011-08-15)

(上接第 53 页)

- A. The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-biomembranes*, 2006, 1758(9):1499-1502.
- [2] Hanson SE, Bentz ML, Hematti P. Mesenchymal stem cell therapy for nonhealing cutaneous wounds[J]. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2010, 125(2):510-513.
- [3] 王彦, 吴奎, 毕玉田, 等. FasL 和 Der p2 双基因共表达真核表达载体的构建及其在树突状细胞中的表达[J]. *重庆医学*, 2010, 39(20):2697-2699.
- [4] 张从纪, 杨彦春, 单佑安. VEGF 基因真核表达载体的构建及其在骨髓间充质干细胞中的表达[J]. *重庆医学*, 2010, 39(1):4-6.
- [5] Javazon EH, Colter DC, Schwarz EJ, et al. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells[J]. *Stem Cells*, 2001, 19(2):219-221.
- [6] Li WZ, Ma N, Ong LL, et al. Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(11):2118-2120.
- [7] Hao L, Wang J, Zou Z, et al. Transplantation of BMSCs expressing hPDGF-A/hBD2 promotes wound healing in rats with combined radiation-wound injury[J]. *Gene Therapy*, 2009, 16(1):34-36.

- [8] Dazzi F, Horwood NJ. Potential of mesenchymal stem cell therapy[J]. *Curr Opin Oncol*, 2007, 19(5):650-653.
- [9] Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history concepts and assays[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 4(2):313-315.
- [10] Falanga V. The chronic wound: impaired healing and solutions in the context of wound bed preparation[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2004, 32(1):88-91.
- [11] Harder J, Meyer-Hoffert U, Wehkamp K, et al. Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid [J]. *J Invest Dermatol*, 2004, 123(3):522-524.
- [12] Luenser K, Ludwig A. Variability and evolution of bovine beta-defensin genes[J]. *Genes Immun*, 2005, 6(1):115-117.
- [13] Wu Z, Hoover DM, Yang D, et al. Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human β -defensin 3[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, 100(44):8880-8883.
- [14] Harder J, Bartels J, Christophers E, et al. Isolation and characterization of human β -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(33):5707-5709.

(收稿日期:2011-06-09 修回日期:2011-08-22)