

· 论 著 ·

不同构型人 α 防御素-5 多肽抗 HSV-2 感染的实验研究*陈 芳,王艾平,陈石磊,耿 放,申明强,陈 默,粟永萍,程天民,王军平 Δ (第三军医大学预防医学院全军复合伤研究所/创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室/
重庆市纳米医药工程技术研究中心,重庆 400038)

摘要:目的 探讨不同构型人 α 防御素-5(HD-5)多肽对单纯疱疹 II 型病毒(HSV-2)感染的抑制作用,分析不同构型 HD-5 抗 HSV-2 活性的差异。**方法** HSV-2 病毒感染体外培养的绿猴肾细胞(Vero 细胞),分别给予 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 HD-5/N、HD-5/Acm 和 HD-5/A 肽处理,72 h 后观察细胞病变效应(CPE),并通过 CCK-8 法测定细胞保护率;建立 HSV-2 感染豚鼠生殖器实验动物模型,按照症状评分方法对不同构型 HD-5 多肽的体内抗 HSV-2 病毒感染作用进行分析。**结果** HD-5/N 与 HD-5/Acm 均能显著抑制 HSV-2 感染体外培养的 Vero 细胞($P < 0.01$),而 HD-5/A 的抗病毒作用不明显;阴道内给予 HD-5/N 多肽 12.5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 治疗 8 d 能显著改善 HSV-2 感染豚鼠的生存状况,提高动物 30 d 存活率($P < 0.01$),外阴感染症状评分显著降低($P < 0.01$),而 HD-5/Acm 治疗效果并不明显。**结论** 天然结构 HD-5 多肽(HD-5/N)在体外或豚鼠阴道内应用均可发挥显著抗 HSV-2 感染的作用,二硫键缺失会显著影响 HD-5 多肽的体内抗病毒效果。

关键词:人 α 防御素-5;单纯疱疹 II 型病毒;HD-5/N;HD-5/Acm;HD-5/A

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.33.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)33-3473-03

The study on inhibitive effects of human α defensin-5 polypeptide with different configuration on HSV-2 infection*Chen Fang, Wang Aiping, Chen Shilei, Geng Fang, Shen Mingqiang,
Chen Mo, Su Yongping, Cheng Tianming, Wang Junping Δ (Institute of Combined Injury/State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury/
Chongqing Engineering Research Center for Nanomedicine College of Preventive Medicine,
Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the inhibitive effects of human α defensin 5 polypeptide(HD-5) on herpes simplex virus type 2(HSV-2) infection, and analyze the inequable anti-HSV-2 activity of HD-5 with different configurations. **Methods** Vero cells infected with HSV-2 *in vitro* were treated respectively with three different configurations of HD-5, including HD-5/N, HD-5/Acm and HD-5/A at a dose of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 72 hours later, cytopathic effect(CPE) was observed under microscope, and the cell viability was determined by CCK-8 assay. Female guinea pigs with genitalias infected with HSV-2 were used to analyze the *in vitro* anti-HSV-2 activity of HD-5 determined by symptom score. **Results** Both HD-5/N and HD-5/Acm could significantly inhibited the infection of Vero cells by HSV-2 *in vitro* ($P < 0.01$), while the antiviral activity of HD-5/A was not obvious. HD-5/N given through vagina at dose of 12.5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for 8 days could significantly improve the living conditions and survival probability of guinea pigs infected with HSV-2 ($P < 0.01$), and the symptom score of genital infection was significantly lower ($P < 0.01$), compared with saline control group. While there was little therapeutic effect of HD-5/Acm used *in vitro* for the treatment of HSV-2 infection. **Conclusion** HD-5 peptide with natural configuration displays a significant anti-HSV-2 ability either *in vitro* or *in vivo*. The lack of disulfide bonds significantly affects the antiviral activity of HD-5 *in vitro*.

Key words: human α defensin -5; herpes simplex virus type 2; HD-5/N; HD-5/Acm; HD-5/A

防御素(defensins)是生物体内产生的一类内源性抗微生物肽,广泛分布于生物体内,具有特定的空间结构^[1]。人防御素分为两类: α 防御素和 β 防御素。人 α 防御素-5(human α -defensin-5, HD-5)除了存在于肠道组织外,在生殖道黏膜上皮也有特异性高表达。 α 防御素包括髓源性的 HNP-1、HNP-2、HNP-3、HNP-4 和肠源性的 HD-5 和 HD-6, β 防御素包括 HBD-1、HBD-2、HBD-3^[2]。人们推测 HD-5 在抵抗生殖道病毒感染过程中可能发挥着一定的作用^[3]。本研究前期对 HD-5 多肽的体外抗单纯疱疹 II 型病毒(herpes simplex virus type 2, HSV-2)作用及机制进行了初步研究^[4]。近来有研究报道,当 HBD-3 的 6 个半胱氨酸被封闭后所合成的线性多肽,同样

具有显著的抗微生物活性^[5-6]。为了对比不同构型 HD-5 多肽的抗病毒能力是否存在差异,本实验从体外和体内两个方面对天然结构、半胱氨酸被 Acm 修饰和半胱氨酸被丙氨酸替换的 3 种不同构型 HD-5 多肽(即 HD-5/N、HD-5/Acm、HD-5/A)的抗 HSV-2 作用进行探讨,旨在为开发相关的抗病毒药物奠定实验基础。

1 材料与方 法

1.1 病毒 HSV-2 由第三军医大学微生物教研室惠赠。病毒经绿猴肾细胞株(Vero)细胞活化增殖,细胞病变效应(CPE)达 75% 以上时收获,毒种保存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。HSV-2 病毒株的 $\text{TCID}_{50} = 10^{-4}$, 实验时采用病毒的浓度为 100 TCID_{50} 。

1.2 HD-5 多肽 (1)HD-5/N:具有天然结构的 HD-5;(2)HD-5/Acm:HD-5 分子中的 6 个半胱氨酸 Cys 均进行乙酰胺甲基修饰,使其不能形成分子内二硫键;(3)HD-5/A:将 HD-5 分子中的 6 个 Cys 均替换为丙氨酸(A)。3 种多肽均由杭州中肽生化有限公司合成(干粉状),用灭菌超纯水配制, -70℃ 保存,临用时用 RPM-1640 培养基稀释至所需浓度。

1.3 细胞 Vero 细胞由第三军医大学军队流行病学教研室惠赠。细胞生长液:1640 培养基+10%胎牛血清,常规培养;细胞维持液:除血清降为 2%外,其余同生长液。

1.4 实验动物及分组 Hartly 雌性豚鼠购自北京腾鑫比尔生物科技有限公司,质量约(200±20)g,共 40 只。将 40 只豚鼠预先取阴道分泌物进行滴板检测无 HSV-2 感染后,随机分为 4 组:正常对照组、HSV-2 病毒感染对照组、HD-5/N 处理组、HD-5/Acm 处理组,每组 10 只。因 HD-5/A 体外无明显的抗病毒作用,因此体内动物实验不设立 HD-5/A 处理组。

1.5 HD-5 多肽体外抗 HSV-2 感染作用分析 Vero 细胞经胰酶消化后以含 10%胎牛血清的 1640 培养液制成 5×10^5 /mL 细胞悬液,加入 96 孔培养板中,于 5%CO₂ 孵箱 37℃ 培养 24 h 后弃生长液改用维持液。分别设立正常对照组、HSV-2 病毒感染对照组、HD-5/N 处理组、HD-5/Acm 处理组、HD-5/A 处理组,每组 6 个复孔,每孔 100 μL。在 HSV-2 病毒感染的同时加入低、中、高浓度(25、50、100 μg/mL)的 HD-5/N、HD-5/Acm、HD-5/A 多肽,于 37℃ 培养,显微镜下观察 CPE。72 h 后 CCK-8 法检测细胞光密度值并计算细胞保护率。细胞保护率=(实验组平均光密度值-病毒对照组平均光密度值)/(细胞对照组平均光密度值-病毒对照组平均光密度值)×100%。

1.6 建立豚鼠生殖器疱疹模型 参照文献[7]方法所述,先用生理盐水棉球搽洗外阴,干棉签摩擦阴道数次,轻轻扳开豚鼠阴道口,使其暴露在外(注意不要损伤阴道黏膜)。用 1 mL 注射器吸取 HSV-2 病毒液并配上灌胃针头伸入豚鼠阴道内 3~4 cm 将病毒液注入阴道穹窿处,后缓慢退出,使其头部向下停留数分钟,以防止病毒液渗出。密切观察豚鼠全身和阴部症状,肉眼可见外阴红肿、疱疹、结痂、破损出血等视为造模成功(5 d 后造模成功),造模成功后即停止注入病毒。

1.7 剂量与给药方法 实验用豚鼠随机分为 4 组:正常对照组、HSV-2 病毒感染对照组、HD-5/N 处理组(12.5 μg·kg⁻¹·d⁻¹)、HD-5/Acm 处理组(12.5 μg·kg⁻¹·d⁻¹),每组 10 只。除正常对照组外,其余 3 组均给予 HSV-2 病毒,病毒滴度为 100 TCID₅₀,感染剂量为 0.025 mL。多肽治疗组则是病毒感染后立即给予多肽治疗,同样采用阴道穹窿给药,1 次/日,连续治疗 8 d。观察豚鼠发病症状及死亡情况,连续 30 d。

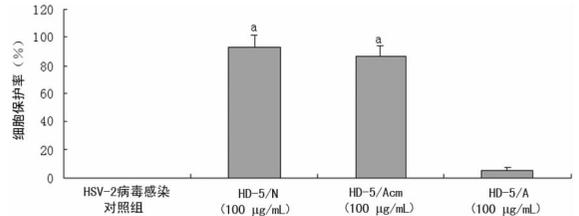
1.8 临床症状变化 症状评分方法:每天观察皮损出现的时间、持续时间和消失时间,其病变程度参照文献[7]进行评分,其评分标准为:0 分:无症状;0.5 分:红肿无损伤;1.5 分:单个小水泡(<2 mm);2.0 分:单个大水泡(>2 mm);2.5 分:多个小水泡或阴道溃疡(出血);3.0 分:多个大水泡;3.5 分:严重外阴肿胀;4.0 分:多个小、大水泡融合;4.5 分:后肢瘫痪;5.0 分:外阴严重溃疡。

1.9 统计学处理 均用 SPSS13.0 统计软件进行单因素方差分析,组间比较采用 *t* 检验,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同构型 HD-5 多肽体外抗 HSV-2 病毒感染作用 显

显微镜观察发现,Vero 细胞在 HSV-2 感染 48 h 时细胞形态即发生明显改变,表现为细胞肿胀、变圆,细胞壁出现褶皱、加厚,相互融合形成葡萄串状或星状,并有脱裂、碎裂现象出现。给予 HD-5/N 或 HD-5/Acm 多肽处理后细胞病变明显受到抑制,且多肽浓度越高对细胞病变的抑制效应越明显,在 100 μg/mL 浓度时,大多数细胞形态均保持完好,而 HD-5/A 处理组与 HSV-2 病毒感染对照组相比差异不明显(封 3 图 1)。CCK-8 法检测细胞活力结果表明,100 μg/mL 的 HD-5/N、HD-5/Acm 和 HD-5/A 处理组对 Vero 细胞的保护率分别为(92.5±8.8)%、(86.1±7.9)%和(4.7±2.2)% (图 2)。提示:HD-5/N 与 HD-5/Acm 均能显著抑制 HSV-2 感染体外培养的 Vero 细胞($P < 0.01$),而 HD-5/A 的抗病毒作用则基本消失。



a: $P < 0.01$, with HSV-2 virus infection control group compared.

图 2 不同构型 HD-5 多肽 HSV-2 感染细胞的保护效应

2.2 不同构型 HD-5 多肽对 HSV-2 感染豚鼠存活率和存活时间的影响 在豚鼠感染病毒第 5 天时,HSV-2 病毒感染对照组即开始出现明显的病毒感染症状,表现为饮食量减少、蜷缩、活动力下降、皮肤青紫等,而且开始出现死亡,至第 11 天 HSV-2 时病毒感染对照组动物全部死亡。HD-5/Acm 处理组豚鼠在病毒感染后第 9 天时开始出现症状,第 10 天时陆续出现死亡,至 30 d 时约 80% 动物死亡。HD-5/N 处理组豚鼠在病毒感染第 29 日时仅 2 只出现轻微的外阴渗血症状,其余体征未见异常(图 3)。可见经 HD-5 多肽治疗后,豚鼠存活率明显提高,平均存活时间(MID)显著延长,其中 HD-5/N 多肽治疗效果明显优于 HD-5/Acm 多肽($P < 0.01$)。

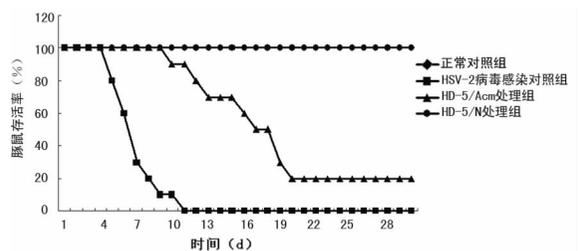


图 3 多肽对 HSV-2 感染豚鼠的保护作用

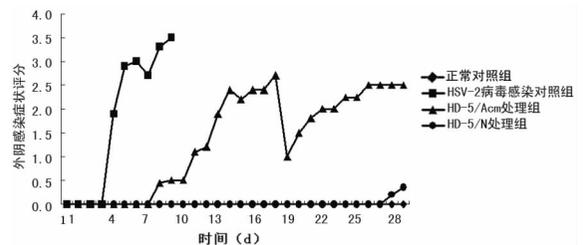


图 4 不同构型 HD-5 多肽治疗组豚鼠临床症状评分

2.3 不同构型 HD-5 多肽对豚鼠外阴症状的影响 从临床症状来看,豚鼠感染病毒后类似于人类外阴生殖器疱疹的感染症状。在病毒接种后第 5 天时,HSV-2 病毒感染对照组出现明显的感染症状,主要表现为外阴红肿、水泡、溃疡、后肢瘫痪等。

与 HSV-2 病毒感染对照组比较,其余各多肽处理组的临床症状轻且病情发展缓慢。HD-5/N 处理组的临床症状最轻,外阴感染症状评分显著低于病毒对照组与 HD-5/Acm 处理组($P < 0.01$),见图 4。表明 HD-5/N 多肽在体内可发挥显著的抗 HSV-2 感染作用,而 HD-5/Acm 的体内治疗效果并不明显。

3 讨论

防御素是一类由中性粒细胞和上皮细胞产生、富含半胱氨酸的内源阳离子抗微生物肽,借助二硫键由 α -螺旋、 β -片层和肽环形成的三维立体结构。近年来研究发现,大部分防御素都具有抗真菌、抗螺旋体以及抗病毒的作用。研究表明防御素分子可以通过阻碍病毒颗粒黏附和侵入靶细胞、抑制病毒复制以及直接破坏病毒包膜等多环节、多层次发挥抗病毒作用,这就使得防御素被用来进行抗病毒时基本不会产生耐药现象^[8-9]。因此,防御素的研制与开发在病毒感染防治方面有良好的应用前景。

人防御素分子内含有三对二硫键, α 、 β 防御素的三对二硫键的连接方式是不同的。 α 防御素连接方式为 1-6,2-4,3-5; β 防御素连接方式为 1-5,2-4,3-6。既往人们认为,防御素的抗微生物活性不仅受时间、pH 值、离子强度和温度等因素的影响,而且还与分子内二硫键的紧密程度有关^[10]。但近来有研究表明,HBD-3 的抗菌作用不受分子内二硫键存在与否的影响,但却与其中的某些半胱氨酸存在与否密切相关。

HD-5 主要由小肠 Peneth 细胞、女性生殖道和男性尿道黏膜上皮分泌。而 HSV-2 主要的感染途径是生殖道,其感染与先天性畸形、流产、宫颈癌、脑炎等多种疾病相关。因此,推测 HD-5 可能对肠道致病菌和生殖道传播病毒具有显著抑制作用,从而参与肠道菌群稳态和生殖道免疫功能的调节^[11-12]。本实验室前期对 HD-5 多肽抗 HSV-2 病毒的作用效果和起效环节进行了初步探讨,结果表明 HD-5 多肽在体外具有显著的抗 HSV-2 感染活性,其作用机制主要是通过干扰病毒对宿主细胞的黏附、侵入而发挥作用。为了探索二硫键及半胱氨酸对 HD-5 多肽抗病毒活性的影响,本次实验在前期实验结果基础上,分别观察 3 种不同构型的 HD-5 多肽在体外和体内的抗 HSV-2 感染作用。结果发现半胱氨酸被丙氨酸替换的 HD-5 多肽基本失去抗 HSV-2 病毒能力,HD-5/N 及 HD-5/Acm 在体外均有显著的抗 HSV-2 病毒感染作用,但 HD-5/N 的体内抗 HSV-2 病毒的作用显著强于 HD-5/Acm。体外研究结果表明 HD-5 分子中的半胱氨酸残基在其抗病毒作用中占有重要位置,对于体内 HD-5/Acm 的抗病毒作用显著减弱的原因,本研究推测可能是因为二硫键缺失后 HD-5 结构不稳定,在体内多种酶的作用下容易被降解,但具体机制尚需以后进一步的研究证实。

综上所述,本研究通过体外细胞实验及体内动物实验证实

了不同构型 HD-5 多肽抗病毒作用的差异,为 HD-5 多肽的进一步开发和合理应用提供了一定的理论依据。

参考文献:

- [1] 杨荣,嵇武.防御素的生物学活性及与疾病的关系[J].肠外与肠内营养,2011,18(3):185-188.
- [2] 赵亚华,徐来祥,黄蓬亮,等.人类防御素的结构与功能研究进展[J].中国比较医学杂志,2006,16(7):436-441.
- [3] Porter E, Yang H, Yavagal S, et al. Distinct defensin profiles in *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* urethritis reveal novel epithelial cell-neutrophil interactions[J]. *Infect Immun*, 2005, 73(8):4823-4833.
- [4] 陈芳,王艾平,申明强,等.人 α 防御素-5 多肽体外抗单纯疱疹 II 型病毒作用的研究[J].第三军医大学学报,2010,32(18):1925-1928.
- [5] Wu Z, Hoover DM, Yang D, et al. Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human beta-defensin 3[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(15):8880-8885.
- [6] Taylor K, Clarke DJ, McCullough B, et al. Analysis and separation of residues important for the chemoattractant and antimicrobial activities of beta-defensin 3[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(11):6631-6639.
- [7] 李振洁,张毅,张奉学,等.四黄虎胶囊抗豚鼠生殖器疱疹病毒感染实验研究[J].岭南皮肤性病科杂志,2008,15(6):336-338.
- [8] Chang TL, Vargas J, DelPortillo A, et al. Dual role of alpha-defensin-1 in anti-HIV-1 innate immunity[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(3):765-773.
- [9] Dugan AS, Maginnis MS, Jordan JA, et al. Human alpha-defensins inhibit BK virus infection by aggregating virions and blocking binding to host cells[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(45):31125-31132.
- [10] Zhao FL, Zhu LQ, Qiao YL. Research progress of β -defensin[J]. *Feed Ind*, 2007, 28(10):6-8.
- [11] Wehkamp J, Bevins CL, Stange EF. Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease[J]. *Gut*, 2009, 58(6):884-884.
- [12] Klotman ME, Chang TL. Defensins in innate antiviral immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(6):447-456.

(收稿日期:2012-02-14 修回日期:2012-09-29)

(上接第 3472 页)

- Crest Stem Cells(EPI-NCSC) and Pluripotency[J]. *Stem Cell Rev*, 2008, 4(4):256-260.
- [10] 刘芳,许家军,张传森,等.成年大鼠毛囊神经嵴干细胞的培养、鉴定及初步诱导分化[J].解剖学杂志,2006,29(5):647-649.
 - [11] Hu YF, Gourab K, Wells C, et al. Epidermal neural crest stem cell(EPI-NCSC) mediated recovery of sensory function in a mouse model of spinal cord injury[J]. *Stem Cell*

Rev, 2010, 6(2):186-198.

- [12] Tumber T, Guasch G, Greco V, et al. Defining the epithelial stem cell niche in skin[J]. *Science*, 2004, 303(5656):359-363.
- [13] Sieber-Blum M, Grim M. The adult hair follicle: cradle for pluripotent neural crest stem cells[J]. *Birth Defects Research Part C (Embryo Today)*, 2004, 72(2):162-172.

(收稿日期:2012-02-08 修回日期:2012-09-23)