

· 综 述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.33.047

抗菌肽促进创伤愈合研究进展

蒋 艳 综述,王仙园 审核

(第三军医大学护理学院:1.基础护理学教研室;2.野战护理学教研室,重庆 400038)

关键词:富组蛋白质类;抗菌肽;创伤;LL-37;防御素**中图分类号:**R329**文献标识码:**A**文章编号:**1671-8348(2014)33-4547-03

抗菌肽(antibacterial peptide),由 10~50 个氨基酸组成,存在于上皮和免疫组织中,具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤活性,人类抗菌肽构成了机体先天性免疫系统的第一道防线,被广泛研究^[1]。目前越来越多的研究表明,抗菌肽的作用远不止于此,它广泛参与维持机体完整性的一系列相关生物学活动,包括创伤修复^[2]。国内相关报道较少,现将其中 3 种抗菌肽与创伤修复研究进展综述如下。

1 LL-37

人体内发现的惟一的 cathelicidins 抗菌肽家族成员,含 37 个氨基酸,主要表达于某些骨髓源性细胞(中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等)、角质形成细胞、组织上皮细胞及某些腺体等易与微生物发生接触的部位,能被感染或创伤诱导产生。研究已证实 LL-37 对革兰阴性和阳性菌有广谱抗菌作用^[3]。而 Dorschner 等^[4]在皮肤无菌手术创缘检测到 LL-37 高表达,推测可能与创伤愈合相关。创伤愈合是一个被多种生长因子和特异性胞内信号通路调节的有序过程,涉及炎症、细胞增殖、迁移及血管再生等多个环节,目前研究逐步发现 LL-37 能够通过多种途径参与伤后上皮重建。

Heiborn 等^[5]发现,皮肤受急性创伤后,LL-37 表达增强,48 h 达到高峰,创面愈合后表达恢复正常;而慢性难愈性溃疡创面虽 LL-37 mRNA 高表达,但其蛋白水平低下,推测与其基因转录过程障碍有关,由此提出 LL-37 水平与创伤正常愈合相关。进一步的研究发现,LL-37 抗体能推迟组织工程皮肤创伤修复,且表皮细胞表面增殖免疫标记物 Ki67 缺失,提示 LL-37 可能是通过影响表皮细胞增殖功能,进而促进创伤修复。而 Carretero 等^[6]的研究发现,LL-37 可以通过诱导皮肤表皮 HacaT 细胞株迁移表型改变,活化黏附相关激酶,加速该细胞迁移;而对手术后大鼠外源性局部补充 LL-37,肉芽组织形成和上皮再生速度加快。除对细胞增殖和迁移功能的影响外,LL-37 能够促进血管内皮细胞增殖而诱导新生血管形成。Koczulla 等^[7]发现,缺乏 LL-37 基因表达的大鼠创伤后新生血管减少,推测 LL-37 介导的血管再生是体内皮肤创伤新生血管形成的重要环节,再次强调了 LL-37 在创伤修复中的应用潜力。

除皮肤组织外,LL-37 对其他部位的创伤愈合同样能起到促进作用。Shyakhiev 等^[8]发现,LL-37 在体外能促进气管上皮细胞以及气管标准细胞株 NCI-H292 增殖和迁移,参与气道创面修复。另有研究者将 LL-37 用于高糖环境下组织工程角膜组织,发现角膜 HCECs 细胞株划痕创伤愈合加快^[9]。Wu 等^[10]的研究发现,鼠 cathelicidin 家族成员 rCRAMP 与胃组织创伤修复有关,胃溃疡创面 rCRAMP 表达上调,rCRAMP 基因治疗通过刺激血管再生、细胞增殖加速溃疡面愈合。

目前多数研究认为,LL-37 促进创伤愈合由受体介导。

LL-37 作用皮肤表皮细胞后 10 min 即能检测出表皮生长因子受体(EGFR)磷酸化,使用 STAT3 通路显性失活突变体转染角质细胞可以抑制 LL-37 诱导的迁移功能,提示 LL-37 的促迁移活性主要与 EGFR 以及下游 STAT3 通路有关^[11]。进一步研究发现,LL-37 作用下,HacaT 细胞基质金属蛋白酶和胞外信号调节激酶,EGFR 或 G 蛋白偶联受体共同活化,促进细胞迁移^[6]。LL-37 对气道表皮细胞作用的机制与之类似,由 EGFR/G 蛋白偶联受体、MAP/胞外调控通路介导^[8]。而 LL-37 活化高糖环境下角膜细胞功能的机制研究显示,LL-7 能部分恢复高糖抑制的 EGFR 途径,延长该通路对创伤的反应,提示 LL-37 可能是 EGFR 通路的增强剂^[9]。而鼠 rCRAMP 促进胃黏膜上皮细胞增殖主要通过 EGFR 反式激活及下游的 ERK1/2 通路介导。由此,许多研究者提出 LL-37 可能是表皮细胞的又一类生长因子^[10]。但具体的 LL-37 作用通路仍需深入研究。

2 富组蛋白家族(histatins, Hsts)

Hsts 是涎腺特异性产物,仅存在于人类和其他灵长类动物唾液中,由 12 个成员组成,以 Hst1、Hst3、Hst5 为主要成员,占总量的 95%,三者含量比为 1:3:1,其中,Hst1、Hst3、Hst5 是主要的研究对象^[12]。目前,研究认为 Hsts 对以口腔黏膜细胞为代表的多种细胞具有促增殖或迁移功能。

Oudhoff 等^[13]利用体外创伤愈合模型研究唾液成分与口腔黏膜创伤愈合的相关性,认为富组蛋白家族是促进口腔黏膜创伤快速愈合的主要影响因素,且在生理浓度 5~100 μg/mL 范围内均具有活化细胞能力。此后,研究者考察了 Hsts 对原代口腔黏膜上皮细胞、口腔成纤维细胞功能的影响,结果一致,据此推测富组蛋白具有维持口腔黏膜组织结构完整性的功能^[14]。研究同时发现,仅腮腺唾液能显著促进创伤愈合外,而其他涎腺唾液几乎无此功能,可能与其他涎腺分泌黏蛋白抑制细胞迁移和黏附有关,但黏蛋白与 Hsts 之间的相关性尚不明了^[15]。Hsts 促口腔黏膜创伤愈合的机制也不清楚,仅认为其促愈机制与其抗真菌机制不同,也不同于其他抗菌肽促愈机制。现有的相关性结论是 Hsts 作用不依赖于 EGFR,与上皮细胞作用可能是通过与 G 蛋白偶联受体结合后内吞,产生一系列效应。初步发现 Hst2 促创伤愈合的活性能被 ERK1/2 通路抑制剂削弱,但该蛋白影响细胞功能具体的胞内信号途径以及活化过程有待进一步研究。另外 Hst2 作用具有结构立体特异性,D-Hst2 无促进口腔黏膜细胞迁移功能^[13]。

尽管富组蛋白仅在唾液内表达,至今未在其他体液内发现,但有研究提示该蛋白对某些非口腔细胞同样具有活化功能。Murakami 等^[16]研究发现,Hst5 呈剂量依赖性促进兔软骨细胞 DNA 合成,并发现 Hst5 与 EGF 具有显著协同作用,联合使用能显著提高该细胞 DNA 合成率近 40 倍,认为

Hst5 可能是 EGF 的生理调节剂。Oudhoff 等^[14] 研究也发现, Hst2 能促进人成纤维细胞迁移, 而促增殖作用较弱, 参与创伤愈合早期, 且无细胞毒性和促炎性反应功能。这为合成富组蛋白用于皮肤创伤修复治疗提供了实验室基础。此外, Hst2 还可以促进乳腺癌来源的表皮细胞株 MCF7 体外创面愈合。综上推测富组蛋白受体不仅仅存在于口腔来源细胞。笔者在体外利用人工合成 Hst1 作用与人表皮细胞 Hacat 细胞株及成纤维细胞株体外划痕创伤, 发现人工划痕修复速度加快^[17]。

由于口腔黏膜创伤较皮肤创伤具有愈合速度快, 愈后无瘢痕的优势, 因此, Hsts 对包括皮肤组织在内的创伤修复作用究竟如何, 作用机制是什么值得进一步研究。

3 人防御素(defensins)

防御素, 含 12~50 个氨基的阳离子蛋白, 在人类该家族包括 α -及 β -两组成员。 α -1、2、3、4 由中性粒细胞产生, α -5、6 由肠组织腺体分泌, β -防御素主要由包括皮肤和呼吸道在内的上皮组织产生^[18]。

研究显示, 烧伤、急性或慢性创伤后, 在 IL-7、TNF- α 和 IL-1 等细胞因子或生长因子作用下, 或细菌(如金黄色葡萄球菌)刺激, 防御素表达增加, 相关的信号通路包括 TLR/NF- κ B, p38MAPK 和 JAK/STAT; 而增加的防御素继而活化 MARK、Akt、STAT1、STAT3 通路, 并活化细胞内 Ca^{2+} , EGFR 磷酸化, 刺激创伤修复细胞, 促进成纤维细胞和角质形成细胞增殖和迁移, 从而加快皮肤创面愈合。另有研究者发现, 人工合成的防御素能促进皮肤成纤维细胞前胶原蛋白和 mRNA 的表达, 同时下调基质金属蛋白酶-1 表达, 以促进细胞外基质沉积而加快伤口愈合, 提示防御素具有促进生物合成和组织重塑反应的作用^[19]。 β -防御素在刺激血管生成方面的作用与 VEGF 相似, 但在 VEGF 抗体作用下时仍能够刺激血管网络形成, 提示防御素促进血管的形成机制不同于 VEGF。

此外, 防御素对气道、角膜、肠道损伤的修复同样能起到加速作用^[20-22]。研究发现低浓度的($\leq 10 \mu\text{g/mL}$)的防御素即能通过活化气道上皮细胞标准株 EFR 和 ERK1/2 通路, 促进该细胞的迁移及增殖, 而加速气道上皮创伤愈合; 同时, 可诱导糖蛋白 MUC5B、MUC5AC 的表达, 与气道上皮细胞分化有关。防御素对肠道上皮创伤的愈合作用以促进上皮细胞迁移为主, 对其增殖作用较弱, 同时可促进其表达黏蛋白 2、3, 改善凋亡。而角膜或结膜创伤后, 泪液中的防御素表达水平增加, 提示其可能参与创伤修复过程。

目前, 临床发现耐药菌株大量出现是影响创面感染控制的一大障碍, 因此, 一方面这些宿主抗菌肽在抵抗病原微生物上表现出极大的应用前景, 另一方面抗菌肽可能是一种影响创伤愈合的直接细胞信号分子, 对皮肤再生具有潜在的治疗性作用, 有一定的研究价值^[23-24]。当前面临的挑战是: 抗菌肽促进创伤愈合的机制, 胞内信号途径究竟如何; 如何建立有效的动物模型, 虽然许多抗菌肽在体外是具有活性的, 但体内模型中超过生理浓度的抗菌肽(除富组蛋白外)对宿主往往是具有毒性的, 局部用药治疗能否帮助克服这种临床障碍; 如何设计抗菌肽治疗药物, 在保留促创伤修复能力的同时降低其细胞毒性^[25]。

参考文献:

[1] De Smet K, Contreras R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins[J]. Biotechnol Lett, 2005, 27(8):1337-1347.
[2] Radek KA, Gallo RL. Amplifying healing; the role of anti-

microbial peptides in wound repair[J]. Adv Wound Care, 2010(1):223-229.
[3] Durr UH, Sudheendra US, Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides[J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1758(9):1408-1425.
[4] Dorschner RA, Pestonjamas VK, Tamakuwala S, et al. Cutaneous injury induces the release of cathelicidin antimicrobial peptides active against group A Streptococcus[J]. J Incest Dermatol, 2011, 117(1):91-97.
[5] Heilborn JD, Nilsson MF, Kratz G, et al. The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium[J]. J Invest Dermatol, 2003, 120(3):379-389.
[6] Carretero M, Escámez MJ, García M, et al. In vitro and in vivo wound healing-promoting activities of human cathelicidin LL-37[J]. J Invest Dermatol, 2008, 128(1):223-236.
[7] Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, et al. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/Hcap18[J]. J Clin Invest, 2003, 111(11):1665-1672.
[8] Shaykhiev R, Beiäwenger C, Ka'ndler K, et al. Human endogenous antibiotic LL-37 stimulates airway epithelial cell proliferation and wound closure[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 289(5):L842-L848.
[9] Yin J, Yu FS. LL-37 via EGFR transactivation to promote high glucose-attenuated epithelial wound healing in organ-cultured corneas[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(4):1891-1897.
[10] Wu WK, Wong CC, LI ZJ, et al. Cathelicidins in inflammation and tissue repair: potential therapeutic applications for gastrointestinal disorders[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2010, 31(9):1118-1122.
[11] Tokumar S, Sayama K, Shirakata Y, et al. Induction of keratinocyte migration via receptor by the antimicrobial peptide LL-37 transactivation of the epidermal growth factor[J]. J Immunol, 2005, 175(7):4662-4668.
[12] Campese M, Sun X, Bosch JA, et al. Concentration and fate of histatins and acidic proline-rich proteins in the oral environment[J]. Arch Oral Biol, 2009, 54(4):345-353.
[13] Oudhoff MJ, Bolscher JG, Nazmi K, et al. Histatins are the major wound-closure stimulating factors in human saliva as identified in a cell culture assay[J]. FASEB J, 2008, 22(11):3805-3812.
[14] Oudhoff MJ, van den Keijbus PA, Kroeze KL, et al. Histatins enhance wound closure with oral and non-oral cells[J]. J Dent Res, 2009, 88(9):846-850.
[15] Sun X, Salih E, Oppenheim FG, et al. Kinetics of histatin proteolysis in whole saliva and the effect on bioactive domains with metal-binding, antifungal, and wound-healing properties[J]. FASEB J, 2009, 23(8):2691-2701.
[16] Murakami Y, Nagata H, Shizukuishi S, et al. Histatin as a synergistic stimulator with epidermal growth factor of rabbit chondrocyte proliferation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 198(1):274-280.

- [17] 蒋艳,王仙园,罗向东. 富组蛋白 1 促进皮肤创伤愈合的细胞学研究[J]. 解放军护理杂志, 2012, 29(3B): 24-26.
- [18] 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.
- [19] Hoq MI, Niyonsaba F, Ushio H, et al. Human cathelicidin enhances migration and proliferation of normal human epidermal keratinocytes[J]. J Dermatol Sci, 2011, 64(2): 108-118.
- [20] Aarbiou J, Verhoosel RM, Van Wetering S, et al. Neutrophil defensins enhance lung epithelial wound closure and mucin gene expression in vitro[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004, 30(2): 193-201.
- [21] Zhou L, Beuerman RW, Huang L, et al. Proteomic analysis of rabbit tear fluid; Defensin levels after an experiment[J]. J Cell Biochem, 2007, 7(17): 3194-3206.
- [22] Otte JM, Werner I, Brand S, et al. Human beta defensin 2 promotes intestinal wound healing in vitro[J]. J Cell Biochem, 2008, 104(6): 2286-2297.
- [23] 王兴顺,耿艺介,李文楚,等. 抗菌肽抗菌机制及其应用研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2012, 40(4): 70-76.
- [24] Seo MD, Won HS, Kim JH, et al. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review [J]. Molecules, 2012, 17(10): 12276-12286.
- [25] Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing[J]. J Dent Res, 2010, 89(3): 219-229.

(收稿日期:2014-08-08 修回日期:2014-09-28)

• 综 述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.33.048

内源性硫化氢含量与帕金森病的相关性研究

郭晶晶 综述,晏 勇[△] 审校

(重庆医科大学附属第一医院神经内科/重庆市神经病学重点实验室 400016)

关键词:帕金森病;内源性硫化氢;相关性

中图分类号:R741

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)33-4549-03

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种神经退行性疾病,其主要病理改变为黑质致密部多巴胺(dopamine, DA)能神经元进行性缺失及残存神经细胞浆内路易小体(lewy body)形成。其主要机制包括蛋白质异常聚集、氧化应激、线粒体功能障碍、神经毒性、炎症反应及细胞凋亡^[1]。硫化氢(H₂S)是继一氧化氮(NO)和一氧化碳(CO)之后发现的第3种内源性气体信号分子,具有抗氧化应激、细胞凋亡及神经系统炎症等作用,而这些生理作用对防治PD和阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)等神经退行性疾病有着重要意义。本文就内源性H₂S与PD的相关性研究进行简要综述。

1 内源性 H₂S 体内合成分解及其生理作用

1.1 H₂S 在体内的合成与分解 H₂S 的合成与 3 种酶相关:胱硫醚-C-裂解酶(CSE)、胱硫醚-B-合酶(CBS)和一组串联酶包括天门冬氨酸转氨酶(AAT)和巯基丙酮酸硫基转移酶(MPST)^[2]。Lee 等^[3]发现,体外培养的星形胶质细胞以每小时 15.06 μmol/g 蛋白质的速度合成 H₂S,其合成速度是小胶质细胞的 7.57 倍,SH-SY5Y 细胞株(人神经母细胞瘤细胞株)的 10.27 倍,NT-2 细胞株的 11.32 倍。实验提示,人血管内皮细胞 H₂S 的合成主要依赖于 CSE 而非 CBS,敲除 CSE 基因会导致血清、心肌、主动脉中 H₂S 的合成降低,而 CBS 基因敲除后则会导致脑组织内 H₂S 合成障碍^[3]。因此,CBS 在脑组织内高表达,而 CSE 主要表达于心血管系统,此外,MPST 主要表达于神经元和血管内皮中^[2]。内源性 H₂S 主要由 L-半胱氨酸 L-cysteine, Cys)和同型半胱氨酸(Hcy)在 CBS、CSE 催化下产生,脑组织合成 H₂S 的主要酶是 CBS。第 1 种酶 CBS 以磷酸吡哆醛(PLP)为辅因子催化半胱氨酸合成 H₂S,包括 β 键的移除反应、β 键的替换反应和(或)α、β 键同时移除反应^[4]。第 2 种酶 CSE 不依赖于磷酸吡哆醛(PLP)就可催化半胱氨酸合成 H₂S。研究表明,H₂S 分解存在 3 种途径:(1)H₂S 在线粒

体内被氧化为硫代硫酸盐(S₂O₃²⁻)、亚硫酸盐(SO₃²⁻)和硫酸盐(SO₄²⁻),然后从尿液排出^[5]。(2)硫醇甲基转移酶(TSMT)催化 H₂S 甲基化生成单二甲基硫醚和双二甲基硫醚。(3)H₂S 与高铁血红蛋白结合生成硫合血红蛋白。此外,H₂S 还可通过与 NO 发生反应被分解。还有报道称 H₂S 可穿过肺泡膜释放^[6]。

1.2 H₂S 的生理作用 H₂S 在大部分组织和血清中的浓度为 50 μmol/L。其中枢系统中的生理作用主要表现在 4 个方面:(1)促进海马长时程增强效应(long-term potentiation, LTP)。一般来说,较弱电刺激作用于海马不能引出 LTP, H₂S 能促进该刺激引发 LTP,这一效应与单纯施加一个强直性电刺激所引发的 LTP 具有等效性。(2)强化 NMDA 受体所介导的应答反应。神经细胞 NMDA 受体是 H₂S 靶受体之一,生理剂量的 H₂S 能显著增加神经细胞 NMDA 受体中谷氨酸转运。Mustafa 等^[7]发现,GAPDH(H₂S 的另一个靶受体)能通过半胱氨酸中硫键断裂形成 SSH 键,使酶活性提高 6 倍,揭示了一个中枢神经系统内的全新的 H₂S 依赖性的细胞能量代谢机制。(3)诱导改变神经细胞钙通道。单独的 H₂S 能诱发星形胶质细胞内钙波的产生,增强胶质细胞通过钙波与周围细胞进行信息交换,从而介导神经元细胞和星形胶质细胞之间的信号传递,调节突触活动。(4)神经元保护作用,其途径主要有 3 种,一是提高细胞内谷胱甘肽(glutathione, GSH)的水平,GSH 作为细胞内重要的抗氧化物质,可阻断氧化反应的产生;二是活化 ATP 敏感性钾通道(KATP channels),这类通道的开放可增强神经元和星形胶质细胞对抗缺血、创伤或神经毒性物质的侵害;三是通过活化腺苷酸环化酶增加胞内环腺苷酸浓度,阻断炎症因子 mRNA 的转录,对抗神经炎症^[8-9]。最新研究表明,释放 H₂S 的非甾体类或左旋多巴的衍生物,即 H₂S 供体的抗氧化及抗炎作用可能更强^[10-12]。