

## · 综述 ·

## 抗菌多肽与呼吸系统疾病防御

张晓岩<sup>1,2</sup> 林江涛<sup>2,3</sup>

呼吸系统是人体与外界相通的三大系统之一,是阻止各种病原微生物和有害物质入侵宿主的首要防线。呼吸道表面覆盖着一薄层粘液分泌物,在呼吸道防御中发挥重要作用,具体表现为以下几个方面:首先,粘液铺衬在呼吸道内壁表面,可以防止上皮脱水并缓和对外来理化刺激;其次,粘附异物颗粒,防止其侵袭小气道和终末呼吸单位;再次,在呼吸道粘膜上形成粘液毯,有助于纤毛运动将异物微粒排出。除了以上物理性防御功能,粘液中尚含有许多防御因子,其中,多种免疫球蛋白、补体等在呼吸系统的免疫性防御功能中发挥重要作用,而体内多种抗菌多肽,也可以通过不同的作用机制保护呼吸道粘膜免受外界有害因子的侵袭,在呼吸系统的非免疫性体液防御系统中发挥重要作用。本文即对呼吸道分泌物中的抗菌多肽及其在呼吸系统防御功能中的作用作一综述。

## 1 呼吸道分泌物中抗菌多肽的组成

早在 80 余年前,英国细菌学家 Fleming A 就提出呼吸道分泌物具有杀菌作用<sup>[1]</sup>,随着研究的逐渐深入,我们知道这种作用正是由其中的抗菌多肽所介导的。而抗菌/杀菌作用的产生与抗菌多肽在呼吸道分泌物中的浓度和活性密切相关。呼吸道含量最丰富的抗菌多肽分别为溶菌酶(lysozyme)、乳铁蛋白(lactoferrin)和分泌型白细胞蛋白酶抑制剂(secretory leukoprotease inhibitor, SLPI),它们主要由呼吸道腺体的浆液细胞产生<sup>[2]</sup>。溶菌酶在支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中浓度约为 10 $\mu$ g/ml<sup>[3]</sup>,在痰中含量为 1mg/ml<sup>[4]</sup>;乳铁蛋白在 BALF 中浓度为 1—10 $\mu$ g/ml,痰中约为 1mg/ml;在 BALF 中,SLPI 浓度为 0.1—0.2 $\mu$ g/ml<sup>[5]</sup>,在鼻分泌物中约为 2.5 $\mu$ g/ml<sup>[6]</sup>。人呼吸道中其他抗菌多肽(包括 $\beta$ -防御素、LL-37 等)的含量还不十分清楚,有研究表明,溶菌酶的含量是 $\beta$ -防御素 HBD-1、HBD-2 的 1000 倍<sup>[7]</sup>。

由于在静止状态下,上皮的液体层非常薄,若想在人或动物体内获得足够的气道分泌物就需要使上皮受到机械的或化学的刺激,或者在某些病理状态下也会引起上皮细胞分泌增加。另外,通常所用的支气管肺泡灌洗的方法不仅使不同部位的气道分泌物混和,而且对分泌物的稀释程度也无法明确,然而以上缺陷并没有阻止人们对呼吸道分泌液的离子和多肽组成的研究。抗菌多肽的来源随解剖部位的不同而有所不同,正常状态下,鼻、气管、支气管的抗菌多肽主要由粘膜下腺体、杯状细胞、血浆或组织液渗出等产生,而在远端终末细支气管和肺泡,Clara 细胞和 II 型肺泡上皮细胞则是主要的分泌细胞<sup>[8]</sup>。某些理化刺激或炎症状态下,呼吸道抗菌多肽的产生明显增加,此时,向呼吸道募集的吞噬细胞(如中性粒细胞、嗜酸粒细胞、单核细胞、巨噬细胞)成为抗菌多肽的重要来源。另有研究发现,在 TH2 细胞因子(IL-4、5、9、13)作用

下,气道上皮细胞可以分化为粘液分泌细胞<sup>[9]</sup>。那么,抗菌多肽的大量产生是否也与细胞因子诱导气道上皮细胞分泌有关呢?

## 2 气道上皮细胞分泌抗菌多肽

气道上皮细胞除分泌炎症介质和趋化因子之外,还分泌多种抗菌多肽。这些分子不仅包括小分子抗菌多肽(如 $\beta$ -防御素和 LL-37),还包括较大的抗菌蛋白(如溶酶体、乳铁蛋白和分泌型白细胞蛋白酶抑制剂)<sup>[10-11]</sup>,这些分子展示了抗菌杀菌或抑制微生物生长的作用,但是会被粘膜附属结构和募集的巨噬细胞所消灭,否则将参与获得性免疫反应。

抗菌多肽是肺组织先天性免疫的效应分子。最近发现它除了具备抗菌活性外,还具有其他多重活性。抗菌多肽在核糖体中合成,基于结构的特点而分组。防御素和组织蛋白酶家族抑制素是两个主要在呼吸道表达的家族。抗菌多肽在人类主要由上皮细胞和吞噬细胞产生和分泌。一些多肽持续产生,如 HBD-1。另外一些多肽通过前炎症介质和微生物产物刺激细胞后产生增加。体外实验证明:HBD-2、HBD-3、HBD-4 和 LL37 可被细菌产物和炎症介质诱导表达<sup>[12]</sup>。感染性疾病(如肺炎或囊性纤维化)患者的各种体液均可见到 $\beta$ -防御素的增加<sup>[13]</sup>。在肺上皮细胞 HBD-2 的活化表达可能是通过巨噬细胞产生较多的 IL-1,是上皮细胞对脂多糖的反应增强所致<sup>[14]</sup>。通常上皮细胞对脂多糖的反应较单核巨噬细胞相比并不敏感,所以这是一个重要的使上皮细胞对细菌产物反应增强的机制。生长因子可增强愈合组织的 HBD-3、人阳离子抗菌蛋白-18(human antimicrobial peptide-18, hCAP-18)和 SLPI 的表达<sup>[15]</sup>。上皮细胞对 LL37 表达的调节依赖于细胞分化的不同阶段<sup>[16]</sup>。

## 3 中性粒细胞来源的抗菌多肽

中性粒细胞浸润是炎症的基本特征。当炎症发生时,中性粒细胞聚集在炎症组织周围,帮助宿主抵抗感染和免疫调节的同时,还可导致组织损伤。中性粒细胞释放的颗粒中包含抗菌多肽,它们被释放到细胞外基质中,不仅参与杀灭微生物,而且影响组织中其他细胞的功能。

来源于中性粒细胞的抗菌多肽是先天性免疫的效应分子,它对于宿主抵抗感染有着举足轻重的地位。当微生物暴露时,先天性免疫反应能力主要依赖于抗菌多肽的产量。事实上,炎症细胞如中性粒细胞、巨噬细胞、树突状细胞和 T 淋

1 中国协和医科大学,北京市东单三条 5 号,100005

2 卫生部中日友好医院呼吸内科

3 通讯作者:林江涛(卫生部中日友好医院呼吸内科)

作者简介:张晓岩,女,硕士研究生,主治医师

收谢日期:2006-03-28

巴细胞是抗菌多肽的主要来源之一。主要来源于中性粒细胞的抗菌多肽有:溶酶体、乳铁蛋白、防御素和组织蛋白酶抑制素<sup>[17]</sup>。防御素和 LL37 是发挥先天性免疫作用的主要成分,在中性粒细胞抗菌活性弱的患者中,防御素和 LL37 出现非特异性缺乏<sup>[18]</sup>。单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞产生抗菌多肽明显少于中性粒细胞和上皮细胞,且它们的功能尚不清楚<sup>[19]</sup>。

#### 4 呼吸道分泌物的抗菌活性

抗菌多肽多为阳离子多肽,有着广谱的抗菌活性。但其活性与其所处分泌物中阳离子的浓度密切相关。Travis 等<sup>[20]</sup>对呼吸道分泌物的抗菌活性进行观察,发现底层培养基 NaCl 浓度较低时(25mM),呼吸道分泌物表现出较强的抗菌活性。而提高 NaCl 浓度至 150mM 时,这种抗菌活性几乎被完全抑制,并且如果用二价阳离子  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  代替  $\text{Na}^+$  时,仅在极低的浓度下其抗菌活性即被明显抑制。这可能是由于阳离子能抑制表面带正电荷的抗菌多肽与表面带负电荷的微生物膜的静电所致,另外,革兰氏阴性细菌外膜与二价阳离子的结合,使细菌的外膜更稳定,从而抵抗抗菌多肽的渗透。

Cole 等<sup>[21]</sup>对从鼻腔获得的少量的分泌物进行研究,结果表明,多数鼻腔分泌物表现出了对金黄色葡萄球菌、E.coli 及绿脓杆菌的抗菌或杀菌活性,而鼻部金葡萄菌的带菌者的分泌物不能抑制金葡萄菌的生长。研究同时发现与鼻腔分泌物共培养后 24h,有的绿脓杆菌恢复其生长能力,表明存活的细菌可以适应鼻部分泌物对其的损伤作用,而如果对鼻腔分泌物进行简单的加热,使其温度达到 100℃时,也不能抑制绿脓杆菌的继续生长。另有研究发现,通过阳离子置换器去除掉鼻部分泌物中的阳离子多肽后,分泌物不能抑制绿脓杆菌生长,而再加入这些阳离子成分后,鼻部分泌物又恢复对绿脓杆菌的抑制作用<sup>[22]</sup>。

这些报道证实了呼吸道分泌物有广谱的抗菌活性,这种活性的产生主要与其阳离子多肽有关。同时这些报道也说明呼吸道分泌物的抗菌活性是不稳定的,可以随着离子环境改变,细菌适应性的改变而消失。

最近研究发现,抗菌多肽存在由 A 组链球菌分泌的天然抑制剂(streptococcal inhibitor of complement,SIC)。它是先天性粘膜反应的抑制剂,被它抑制的抗菌多肽包括溶酶酶、LL37、人白细胞蛋白 1 (human neutrophil peptide, HNP-1)、HBD-1、HBD-2 和 HBD-3<sup>[23]</sup>。Timothy 等<sup>[24]</sup>体外培养气道上皮细胞发现,前炎症因子 IL-1 $\beta$  可诱导 HBD-2mRNA 的表达,地塞米松可抑制其表达;HBD-1 的表达与 HBD-2 相比处于低水平,但可被地塞米松所诱导。抗菌多肽的活性决定它们之间的协同作用,它们的浓度呈非线性依赖关系,当超过阈值后迅速达到饱和状态。它们与脂质双分子层相结合,产生两种不同的状态并有着两种不同的分子结构,是其协同作用的分子机制<sup>[25]</sup>。

#### 5 抗菌多肽在呼吸系统疾病中的防御作用

抗菌多肽与肺部炎症关系最为密切。其实,有活性的抗菌多肽在炎症过程中对机体的作用并不完全是抗菌杀菌,它们被释放入细胞外基质的早期尚可发挥其增强宿主防御功

能,但很快出现细胞毒性和趋化现象,造成机体损伤<sup>[26]</sup>。如当防御素浓度>50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,对包括气道上皮细胞在内的各种细胞发挥细胞毒作用<sup>[27]</sup>。在这个浓度下,防御素可诱导上皮细胞释放中性粒细胞趋化因子 IL-8 和中性粒细胞活化蛋白 78,它们又间接地提高中性粒细胞在炎症位点的募集和活化<sup>[28]</sup>。在小鼠的气管内给予防御素可导致急性气道炎症和呼吸功能不全<sup>[29]</sup>。多种肺部炎症疾病的患者血浆中防御素水平超过 1.5mg/ml<sup>[30]</sup>。同样,在炎症过程中,LL-37 的表达增加<sup>[31]</sup>。LL-37 本身是中性粒细胞、嗜酸粒细胞、单核细胞、T 细胞和肥大细胞的趋化因子<sup>[32]</sup>,也可诱导上皮细胞释放其他趋化因子<sup>[33]</sup>。并且它还影响单核细胞、巨噬细胞和肥大细胞释放炎症介质和细胞因子<sup>[34]</sup>。最近的研究表明,LL37 是小分子多肽,它的抗菌活性在有核细胞诱导 IL-8 产生后消失<sup>[35]</sup>。

一项关于囊性纤维化患者的支气管肺泡灌洗液中  $\beta$ -防御素和 LL37 浓度的研究发现,炎症因子浓度的增加伴随有 LL37 浓度的升高。肺功能恶化时伴随 HBD-2 的减少,但 LL37 的水平却增加<sup>[36]</sup>。说明 LL37 和支气管炎症相关,严重的疾病可导致  $\beta$  防御素减少,并继发宿主防御缺陷。

最近,Elahi 等<sup>[37]</sup>研究猪防御素-1 (pig beta defeasin, pBD-1) 保护机体防御呼吸道感染的作用。由于 pBD-1 和 HBD-2 同源,他们制造了猪百日咳模型。结果显示:这种模型制造下新出生的小猪容易患非常严重的支气管肺炎,而 4 周大的小猪呼吸道 pBD-1 表达增强,对百日咳博德特氏菌有很强的抗菌活性。说明宿主体内的防御多肽可保护宿主免受百日咳博德特氏菌的攻击,并成为在调节先天性免疫反应中发挥中心作用。

多项实验进行抗菌多肽对肿瘤发生发展作用的研究,但是并未获得肯定结论。基于防御素对上皮细胞的作用是随着浓度的不同而不同,甚至产生促有丝分裂和细胞毒作用,推测其可能刺激肿瘤细胞的增殖或杀伤这些细胞。的确,在肾脏肉瘤的体外实验,发现人  $\alpha$  防御素 (HNP-1、HNP-2 和 HNP-3) 影响肿瘤细胞的增殖<sup>[38]</sup>。即使这样,防御素在肺癌中的作用并不清楚。然而,有证据表明抗菌多肽处于较高水平的慢性气道炎症存在发展为肺癌的倾向<sup>[39]</sup>。有趣的是,最近的研究显示防御素可抑制新生血管的生成,实现其潜在的抗肿瘤活性<sup>[40]</sup>。这一研究提示我们,防御素可能是一种新型天然的新生血管生成的抑制剂,且抗菌多肽在不同环节作用于肿瘤发挥不同作用。

#### 6 小结

呼吸系统表面存在多种抗菌多肽。在健康和疾病状态下不同浓度的抗菌多肽生物学效应不同,并参与呼吸系统炎症、囊性纤维化、肺损伤、肺癌等多种疾病的发病机制。多种抗菌多肽具有广谱、高效的抗微生物活性,作为内源性“超级抗菌素”对解决细菌耐药问题有着较好的前景。

#### 参考文献

- [1] Fleming A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions [J]. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1922, 93: 306—317.
- [2] Basbaum CB, Jany B, Finkbeiner WE. The serous cell [J]. Annu

- Rev Physiol, 1990, 52:97—113.
- [3] Thompson AB, Bohling T, Paywandi F, et al. Lower respiratory tract lactoferrin and lysozyme arise primarily in the airways and are elevated in association with chronic bronchitis[J]. *J Lab Clin Med*, 1990, 115:148—158.
  - [4] Harbitz O, Jenssen AO, Smidsrod O. Lysozyme and lactoferrin in sputum from patients with chronic obstructive lung disease[J]. *Eur J Respir Dis*, 1984, 65:512—520.
  - [5] Kouchi I, Yasuoka S, Ogura T. Analysis of secretory leukocyte protease inhibitor in bronchial secretions from patients with hypersecretory respiratory diseases [J]. *Tokushima J Exp Med*, 1993, 40:95—107.
  - [6] Lee CH, Igarashi Y, Hohman RJ, et al. Distribution of secretory leukoprotease inhibitor in the human nasal airway [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1993, 147:710—716.
  - [7] Singh PK, Jia HP, Wiles K, et al. Production of  $\beta$ -defensins by human airway epithelia [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 14961—14966.
  - [8] Ganz T. Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract[J]. *J Clin Invest*, 2002, 109:693—697.
  - [9] Will-Karp M. Trophic slime, allergic slime [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000, 22:637—639.
  - [10] Hiemstra PS. Epithelial antimicrobial peptides and proteins: their role in host defence and inflammation[J]. *Paediatr Respir Rev*, 2001, 2: 306—310.
  - [11] Schutte BC, McCray PB Jr. [beta]-defensins in lung host defense[J]. *Annu Rev Physiol*, 2002, 64:709—748.
  - [12] Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Dale BA. Regulation of human beta-defensin-2 in gingival epithelial cells: the involvement of mitogen-activated protein kinase pathways, but not the NF-kappaB transcription factor family [J]. *J Immunol*, 2002, 168: 316—324.
  - [13] Bals R, Weiner DJ, Meegalla RL, et al. Salt-independent abnormality of antimicrobial activity in cystic fibrosis airway surface fluid[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 25:21—25.
  - [14] Tsutsumi-Ishii Y, Nagaoka I. Modulation of human beta-defensin-2 transcription in pulmonary epithelial cells by lipopolysaccharide-stimulated mononuclear phagocytes via proinflammatory cytokine production [J]. *J Immunol*, 2003, 170: 4226—4236.
  - [15] Sorensen OE, Cowland JB, Theilaggrd-Monch K, et al. Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors[J]. *J Immunol*, 2003, 170:5583—5589.
  - [16] Schaubert J, Svanholm C, Termen S, et al. Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signaling pathways [J]. *Gut*, 2003, 52: 735—741.
  - [17] Sandra van Wetering, Tjabringa GS, Pieter S Hiemstra. Interactions between neutrophil-derived antimicrobial peptides and airway epithelial cells[J]. *J Leukoc Biol*, 2005, 77:444—450.
  - [18] Putsep K, Carlsson G, Boman H, et al. Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study[J]. *Lancet*, 360:1144—1149.
  - [19] Duits L, Ravensbergen B, Rademaker M, et al. Expression of  $\beta$ -defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells [J]. *Immunology*, 2002, 106, 517—525.
  - [20] Travis SM, Conway BD, Zabner J, et al. Activity of abundant antimicrobials of the human airway [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999, 20:872—879.
  - [21] Cole AM, Dewan P, Ganz T. Innate antimicrobial activity of nasal secretions[J]. *Infect Immun*, 1999, 67:3267—3275.
  - [22] Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3, 710—720.
  - [23] Fernie-King BA, Seilly DJ, Lachmann PJ. Inhibition of antimicrobial peptides by group A streptococci: SIC and DRS [J]. *Biochim Soc Trans*, 2006, 34:273—275.
  - [24] Timothy DS, Birgitta A, Gudmundui H, et al. Expression and activity of  $\beta$ -defensins and LL37 in the developing human lung[J]. *The Journal of Immunology*, 2005, 174:1608—1615.
  - [25] Huang HW. Molecular mechanism of antimicrobial peptides: The origin of cooperativity[J]. *Biochim /biophys Acta*, 2006, 28:Epub ahead of print.
  - [26] Hiemstra PS. Defensins and cathelicidins in inflammatory lung disease: beyond antimicrobial activity [J]. *Biochem Soc Trans*, 2006, 34:276—278.
  - [27] Panyutich AV, Hiemstra PS, van Wetering S. Human neutrophil defensin and serpins form complexes and inactivate each other [J]. *Am j Respir Cell Mol Biol*, 1995, 12:351—357.
  - [28] Van WS, Mannesse LSPG, Wan SMAGA, et al. Neutrophil defensins stimulate the release of cytokines by airway epithelial cells: modulation by dexamethasone[J]. *Inflamm Res*, 2002, 51:8—15.
  - [29] Zhang H, Porro G, Orzech N, et al. Neutrophil defensins mediate acute inflammatory response and lung dysfunction in dose-related fashion [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 280:L947—L954.
  - [30] Aarbiou J, Rabe KF, Hiemstra PS. Role of defensins in inflammatory lung disease[J]. *Ann Med*, 2002, 34:96—101.
  - [31] Ong PY, Ohtake T, Brandt C, et al. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis [J]. *N Engl J Med*, 2002, 347:1151—1160.
  - [32] Tjabringa GS, Ninaber DK, drijfhout JW, et al. The human cathelicidin LL-37 is a chemoattractant for eosinophils and neutrophils that acts via formyl-peptide receptors[J]. *Eur Respir J*, 2004, 24:36s.
  - [33] Tjabringa GS, Aarbiou J, Ninaber DK, et al. The antimicrobial peptide LL-37 activates innate immunity at the airway epithelial surface by transactivation of the epidermal growth factor receptor[J]. *J Immunol*, 2003, 171:6690—6696.
  - [34] Bowdish DM, Kavidson DJ, Speert DP, et al. The human cationic peptide LL-37 induces activation of the extracellular signal-regulated kinase and p38 kinase pathways in primary human monocytes[J]. *J Immunol*, 2004, 172:3758—3765.
  - [35] Murakami M, Lopez-Garcia, Braff M, et al. Postsecretory processing generates multiple cathelicidins for enhanced topical antimicrobial defense[J]. *J Immunol*, 2004, 172, 1146—1156.
  - [36] Chen CI, Schaller-Bals S, Paul KP, et al. Beta-defensins and LL37 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with cystic fibrosis[J]. *J Cyst Fibros*, 2004, 3:45—50.
  - [37] Elahi S, Buchanan RM, Attah-Poku S, et al. The host defense peptide Beta-Defensin 1 confers protection against bordetella pertussis in newborn piglets [J]. *Infect immune*, 2006, 74:2338—2352.
  - [38] Kohri K, Ueki IF, Nadel JA. Neutrophil elastase induces mucin production by ligand-dependent epidermal growth factor receptor activation [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 283:L531—L540.
  - [39] Bauer AK, Malkinson AM, Kleeberger SR, et al. Susceptibility to neoplastic and non-neoplastic pulmonary diseases in mice: genetic similarities [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 287:L685—L703.
  - [40] Chavakis T, Cines DB, Rhee JS, et al. Regulation of neovascularization by human neutrophil peptides ( $\alpha$ -defensins): a link between inflammation and angiogenesis [J]. *FASEB J*, 2004, 18: 1306—1308.